

ÜBER DIE KURZZEITREGULATION DES
LEBERSTOFFWECHSELS DURCH GLUCAGON:
Wirkungen auf Glykogenolyse, Glykolyse, Sauerstoff-
verbrauch und Ketogenese, Kinetiken der direkten
und indirekten Glucagoneffekte, Interaktionen der
Stoffwechselprozesse im "transient" und im "steady
state", untersucht in der isolierten, nicht-
rezirkulierend perfundierten Rattenleber

RAINER KIMMIG

1985 6

*Diss
München*

AUS DEM INSTITUT
FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE, PHYSIKALISCHE BIOCHEMIE UND
ZELLBIOLOGIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstände:
Prof. Dr. E.M. Klingenberg - Prof. Dr. Dr. W. Neupert
Prof. Dr. H.G. Zachau

ÜBER DIE KURZZEITREGULATION DES LEBERSTOFFWECHSELS

DURCH GLUCAGON:

Wirkungen auf Glykogenolyse, Glykolyse, Sauerstoffverbrauch und
Ketogenese, Kinetiken der direkten und indirekten Glucagoneffekte,
Interaktionen der Stoffwechselprozesse im 'transient' und im
'steady state', untersucht in der isolierten,
nicht-rezirkulierend perfundierten Rattenleber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Rainer Kimmig

aus

Stuttgart

1985

Kurzfassung des Titels:

KURZZEITREGULATION DES LEBERSTOFFWECHSELS DURCH GLUCAGON
IN DER PERFUNDIERTEN RATTENLEBER

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatte r: Prof. Dr. med. Roland Scholz

Mitberichterstatte r: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Walter Neupert

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. März 1986

MEINEN ELTERN

IN DANKBARKEIT

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	<u>Glucagon</u>	1
1.2	<u>Stoffwechselwirkungen des Glucagons</u>	2
1.2.1	Glykogenolyse und Glykolyse.....	2
1.2.2	Sauerstoffverbrauch der Leber.....	4
1.2.3	Ketonkörperproduktion.....	5
1.3	<u>Ziele der Arbeit</u>	8
2	<u>METHODIK UND ANALYTIK</u>	10
2.1	<u>Leberperfusion</u>	10
2.1.1	Hämoglobinfreie Leberperfusion im nicht-rezirkulierenden System.....	10
2.1.2	Perfusionsapparatur.....	11
2.1.3	Perfusionslösung.....	13
2.1.4	Versuchstiere und Operationstechnik.....	14
2.1.5	Physiologie der isolierten, sauerstoffträgerfrei perfundierten Leber.....	15
2.1.6	Durchführung der Experimente.....	16
2.2	<u>Analytik</u>	17
2.2.1	Sauerstoffmessung.....	17
2.2.2	Metabolitbestimmung.....	18
2.2.3	¹⁴ CO ₂ -Messung im Perfusat.....	19
2.2.4	Isolierung von Glucose und Lactat durch Säulenchromatographie.....	19
2.2.5	Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie.....	20
2.3	<u>Materialien</u>	21
2.4	<u>Enzyme und Abkürzungen</u>	21

II

3	ERGEBNISSE.....	23
3.1	<u>Lactat- plus Pyruvatproduktion als Maß für den glykolytischen Fluß.....</u>	23
3.1.1	Pyruvatoxidation.....	24
3.1.2	Gluconeogenese.....	28
3.2	<u>Glucagonwirkung auf Glykogenolyse und Glykolyse.....</u>	32
3.2.1	Stimulation der Glykogenolyse und Hemmung der Glykolyse mit Glykogen als Substrat durch Glucagon.....	32
3.2.2	Dosis-Wirkungsbeziehung des Glucagoneffekts auf Glykogenolyse und Glykolyse.....	34
3.2.3	Glucagon-bedingte Veränderungen in Glykogenolyse und Glykolyse in hoher zeitlicher Auflösung.....	38
3.2.4	Analyse der Kinetik der durch Glucagon bewirkten Steigerung der Glykogenolyse.....	44
3.2.5	Hemmung der Glykogenolyse durch Glucose und Aufhebung der Hemmung durch Glucagon.....	46
3.3	<u>Glucagonwirkung auf den Sauerstoffverbrauch.....</u>	49
3.3.1	Glucagoneffekt auf den Sauerstoffverbrauch der substratfrei perfundierten Leber einer gefütterten Ratte.....	49
3.3.2	Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen den Änderungen in der Geschwindigkeit von Glykogenolyse, Glykolyse sowie des Sauerstoffverbrauchs und der Glucagonkonzentration.....	53
3.3.3	Korrelation zwischen Anstieg im Sauerstoffverbrauch und Abfall der Glykolysegeschwindigkeit nach Glucagon.....	56
3.3.4	Glucagoneffekt auf den Sauerstoffverbrauch in Lebern mit geringem glykolytischen Fluß.....	57
3.4	<u>Glucagonwirkung auf die Ketogenese.....</u>	61
3.4.1	Ketogenese in Lebern gefütterter Ratten.....	61
3.4.1.1	Ketogenese aus endogenem Substrat.....	61
3.4.1.2	Ketogenese aus Oleat als exogenem Substrat.....	63
3.4.1.3	Abhängigkeit des Glucagoneffekts von der Fettsäurekonzentration.....	65
3.4.1.3.1	Ketogenesegeschwindigkeit bei verschiedenen Oleat- und Albuminkonzentrationen.....	65
3.4.1.3.2	Zusammenfassung der Effekte von Glucagon auf die Ketogenesegeschwindigkeit.....	72
3.4.1.3.3	$^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus $[1-^{14}\text{C}]\text{Oleat}$	72
3.4.1.3.4	Mitochondrialer Redoxzustand.....	74
3.4.2	Ketogenese aus endogenem Substrat und aus Oleat in Lebern gehungerter Ratten.....	76
3.4.3	Glykolyse und Ketogenese.....	77

III

3.4.3.1	Beeinflussung der Ketogenese durch Glucose und Lactat plus Pyruvat in An- und Abwesenheit von Glucagon.....	80
3.4.3.2	Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der extrazellulären Lactat- plus Pyruvatkonzentration und der Ketogenesege- schwindigkeit.....	86
4	DISKUSSION.....	91
4.1	<u>Glucagonwirkung auf Glykolyse und Glykogenolyse.....</u>	91
4.1.1	Direkter Nachweis einer Glucagon-bedingten Hemmung des Glykolyseflusses durch Messung der Lactat- plus Pyruvat- produktion aus Glykogen in nicht-rezirkulierend perfun- dierten Lebern gefütterter Ratten.....	91
4.1.2	Mechanismus der Glucagon-bedingten Hemmung der Glykolyse	93
4.1.3	Interpretation der Kinetik der Glykolysehemmung nach Glu- cagon auf der Grundlage des derzeitigen Kenntnisstandes der Enzymologie.....	97
4.2	<u>Glucagonwirkung auf den Sauerstoffverbrauch.....</u>	98
4.3	<u>Glucagonwirkung auf die Ketogenese.....</u>	101
4.3.1	Mechanismus einer intrahepatischen Regulation der Ketoge- nese.....	101
4.3.2	Abhängigkeit der Ketogenesestimulation durch Glucagon vom metabolischen Zustand der Leber sowie von der angebotenen Fettsäurekonzentration.....	104
4.3.3	Abhängigkeit der Ketogenese von der zellulären Verfüg- barkeit von Lactat und Pyruvat: Mechanismus der Ketoge- nesestimulation als indirekte Glucagonwirkung.....	105
4.3.4	Synergismus von Oleat und Glucagon im Rahmen der Ketoge- neseregulation.....	107
4.3.5	Physiologische Relevanz der intrahepatischen Ketogenese- regulation durch Glucagon.....	108
4.4	<u>Zusammenfassende Schlußbemerkung.....</u>	110
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	111
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	114
7	LEBENSLAUF.....	134

1 EINLEITUNG

1.1 Glucagon

Erste Berichte über eine Substanz mit einer dem Insulin entgegengesetzten Wirkung stammen aus der Zeit um 1925, als man die Wirkungen des soeben entdeckten Hormons aus den Inselzellen des Pankreas untersuchte. Es wurde beobachtet, daß nach Gabe von Insulinpräparationen vorübergehend auch eine Blutzuckersteigerung auftreten kann ("primäre paradoxe Insulinhyperglykämie" [20]), die dem Insulin selbst zugeschrieben wurde [20, 32], für die aber auch mögliche Verunreinigungen diskutiert wurden [55, 81]. Als es ABEL gelang, eine Insulinpräparation ohne Hyperglykämie-erzeugende Aktivität herzustellen [3], und nachgewiesen wurde, daß diese in der zur Präparation verwendeten Mutterlösung zurückblieb [54], mußte dieser Effekt einer anderen Substanz als dem Insulin zugeschrieben werden. In der Folge wurde diese Substanz aufgrund ihrer Glucose-mobilisierenden Eigenschaft Glucagon genannt [19]. Erst 1953 wurde es von STAUB [162] isoliert und kristallisiert und 1957 von BROMER [17] als ein aus 29 Aminosäuren bestehendes Polypeptid (MG 3485) identifiziert.

Glucagon (Übersichtsarbeiten [48, 147]) wird von den sogenannten A-Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas gebildet [121]. Allerdings werden Glucagon-ähnliche Polypeptide auch in anderen exokrinen Drüsen sowie in bestimmten Zellen des Gastrointestinaltraktes produziert [93]. Die Ausschüttung des Glucagons ins Blut wird durch metabolische, hormonelle und nervale Faktoren beeinflusst; die wichtigsten Faktoren sind die Blutkonzentration von Substraten, insbesondere Glucose, aber auch Aminosäuren und freie Fettsäuren [10]. Die Extraktion des Glucagons aus der Blutbahn

findet vorwiegend in der Niere [39, 49] und nur zu einem geringen Teil in der Leber [25, 46] statt.

1.2 Stoffwechselwirkungen des Glucagons

Neben seinen Langzeitwirkungen auf den intermediären Stoffwechsel im Sinne einer Biosynthesehemmung, die durch Enzym-Induktion und Suppression vermittelt werden, besitzt Glucagon eine Reihe von Kurzzeitwirkungen auf den Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel in verschiedenen Organen. In der vorliegenden Arbeit werden die Glucagonwirkungen auf Glykogenolyse, Glykolyse, Sauerstoffverbrauch und Ketogenese in der isolierten, perfundierten Rattenleber untersucht.

1.2.1 Glykogenolyse und Glykolyse

Die stimulierende Wirkung von Glucagon auf die hepatische Glucoseproduktion wurde 1959 von SHOEMAKER [148] nachgewiesen. Bald darauf konnte gezeigt werden, daß Glucagon in der Leber nach Bindung an einen membranständigen Rezeptor die Bildung von Cyclo-AMP als 'second messenger' (Übersicht [134, 135]) auslöst, das dann über die Aktivierung von spezifischen Proteinkinasen eine Phosphorylierung der Enzyme des Glykogenstoffwechsels bewirkt. Die dadurch bedingte Inaktivierung der Glykogensynthetase und gleichzeitige Aktivierung der Glykogenphosphorylase resultiert in einer Steigerung der Netto-Glykogenolyse, die an isolierten Leberpräparationen nachgewiesen wurde (Übersicht [45, 64]).

Ebenfalls über einen Cyclo-AMP-vermittelten Mechanismus führt Glucagon zu einer raschen Inaktivierung der glykolytischen Schlüsselenzyme Phosphofructokinase und Pyruvatkinase, die durch zahlreiche Untersuchungen an

verschiedenen Leberpräparationen belegt ist [9, 14, 24, 28, 30, 44, 76, 77, 124, 126, 132, 166]. Man nahm an, daß die beobachtete Verminderung der Enzymaktivitäten analog zur Regulation des Glykogenstoffwechsels die direkte Folge einer Interkonversion durch Phosphorylierung sei [9, 14, 24, 44, 76, 132]; allerdings wurde diese Hypothese für die Phosphofructokinase in Frage gestellt [30]. Die Diskussion wurde 1980 neu belebt, als mit Fructose-2,6-Bisphosphat ($\text{Fru}(2,6)\text{P}_2$) ein potenter Aktivator der Phosphofructokinase identifiziert wurde (Übersichtsarbeit [65]), dessen Konzentration durch Glucagon beeinflußt werden kann [65, 69, 130].

Trotz der nachgewiesenen Beeinflussung der Aktivitäten glykolytischer Schlüsselenzyme durch Glucagon war lange Zeit nicht geklärt (im Gegensatz zum Nachweis der gesteigerten Glykogenolyse), ob Glucagon tatsächlich zu einer Verminderung des Substratflusses durch die Glykolyse führt. KERZEL konnte 1982 am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber zeigen, daß nach Glucagongabe die Bildung von Lactat und Pyruvat aus Glykogen und exogener Glucose vermindert ist [79]. In seiner Dissertation hatte KERZEL die Lactat- plus Pyruvatbildung aufgrund von theoretischen Überlegungen als Maß für den Substratfluß durch die Glykolyse verwendet, ohne einen experimentellen Beweis dafür zu erbringen. Des weiteren hatte er anhand von Einzelversuchen die Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen Glucagonkonzentration und der Hemmung der Glykolyse bzw. Stimulation der Glykogenolyse angedeutet. Es war das anfängliche Ziel der vorliegenden Arbeit, die KERZELschen Untersuchungen zu vertiefen und darauf aufbauend unsere Kenntnisse von der Glucagonwirkung auf die isolierte perfundierte Leber zu erweitern. Dazu war es aber zunächst erforderlich, experimentell zu überprüfen, inwieweit die Ausschüttung von Lactat plus Pyruvat aus der Leber ein verlässlicher Parameter für die quantitative Bestimmung des glykolytischen Flusses ist

bzw. wie groß unter den verschiedenen Bedingungen der Fehler ist. Ein weiterer Ansatzpunkt waren die möglicherweise unterschiedlichen Dosis-Wirkungsbeziehungen von Glucagon-bedingter Hemmung der Glykolyse und Stimulation der Glykogenolyse, welche die KERZELschen Experimente nahelegten. Bevor aber diese Unterschiede als experimentelle Tatsache akzeptiert und Überlegungen hinsichtlich des zugrundeliegenden Wirkungsmechanismus und der Wechselwirkungen im intermediären Stoffwechsel angestellt werden konnten, mußten die Einzelbeobachtungen in einer größeren experimentellen Serie abgesichert werden.

1.2.2 Sauerstoffverbrauch der Leber

Im Zusammenhang mit den obengenannten Untersuchungen zur Glykolyseregulation fiel ein deutlicher Anstieg des Sauerstoffverbrauchs nach Glucagongabe auf, der mit der Hemmung der Lactat- plus Pyruvatproduktion koinzidierte. Eine Stimulation der hepatischen Atmung durch Glucagon wurde bereits unter verschiedensten Bedingungen nachgewiesen [59, 122, 164, 188, 192, 193]. Dieser Effekt wurde zum einen mit einem erhöhten Energiebedarf für biosynthetische Stoffwechselprozesse (wie Harnstoffproduktion und Gluconeogenese [122, 188]), zum anderen aber auch mit direkten Effekten auf die mitochondriale Atmungskette [59, 154, 155] erklärt; letztere wurden jedoch später von den betreffenden Autoren selbst als mögliche Artefakte interpretiert [60, 151]. Die Glucagon-bedingte Stimulation des hepatischen Sauerstoffverbrauchs (z.B. unter Bedingungen geringer Gluconeogenese und Harnstoffproduktion in Lebern gefütterter Tiere) konnte somit bislang nicht ausreichend erklärt werden. In der vorgelegten Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Glykolysehemmung ursächlich für die Atmungsstimulation verantwortlich ist.

1.2.3 Ketonkörperproduktion

Außer seinen Wirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel, die in erster Linie zur Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase dienen, bewirkt Glucagon auch eine Stimulation der Ketonkörperproduktion in der Leber, die einen Anstieg der Ketonkörper im Blut zur Folge hat. Ketonkörper (Acetoacetat und 3-Hydroxybutyrat) entstehen in der Leber intramitochondrial nach partieller Oxidation von Fettsäuren zu Acetyl-CoA im Hydroxymethylglutaryl-CoA-Zyklus (HMG-CoA-Zyklus). Sie dienen als Substrat - alternativ zu Glucose - für die Oxidation in peripheren Geweben (ausgenommen Erythrozyten und Nebennierenmark), wenn Glucose nicht in ausreichender Menge verfügbar ist (z.B. im Hunger; Übersicht in [133]). Das ist besonders für das ZNS wichtig, dessen Zellen auch bei Glucosemangel nicht in der Lage sind, Fettsäuren zu oxidieren [133]. Über die möglichen Angriffspunkte für eine Regulation der Ketogenese wurden in der Vergangenheit kontroverse Hypothesen diskutiert, auf die im folgenden kurz eingegangen werden soll (Übersichtsarbeiten zur Regulation der Ketogenese [50, 87, 91, 103, 158, 163, 180, 184, 194]).

Erhöhte Fettsäurekonzentrationen im Blut gehen in der Regel mit einer erhöhten Ketonkörperproduktion einher; es wurde daher ursprünglich angenommen, daß die Geschwindigkeit der Ketogenese allein vom Fettsäureangebot an die Leber abhängt [8, 61, 120]. Zahlreiche Befunde widersprachen jedoch dieser Hypothese [37, 97-99, 145, 172] und gaben Anlaß zu Untersuchungen hinsichtlich (zusätzlicher) intrahepatischer Regulationsmechanismen. Es ist unbestritten, daß Glucagon das Fettsäureangebot an die Leber infolge Cyclo-AMP-abhängiger Stimulation der Lipolyse im Fettgewebe erhöht [23, 35, 78, 115] und daß dadurch indirekt die hepatische Ketonkörperproduktion

gesteigert wird [7, 78, 94]. Strittig ist jedoch, ob Glucagon bei der Steigerung der Ketogenese neben seiner Wirkung auf das Fettgewebe auch direkt auf die Leber einwirkt, d.h. ob Glucagon an der intrahepatischen Regulation beteiligt ist.

Folgende intrahepatische Angriffspunkte der Ketogeneseregulation werden - insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Glucagonwirkung - diskutiert:

1. Endogene Lipolyse:

Eine Stimulation von hepatischen Lipasen durch Glucagon wurde zwar postuliert [7, 31], konnte aber nicht nachgewiesen werden [38, 96, 115].

2. Veresterung versus Oxidation aufgenommener Fettsäuren:

Die Geschwindigkeit, mit der die Leber Fettsäuren verestert, soll von der Glycerol-3-Phosphat-Konzentration abhängen [51, 96, 97, 170]; Glucagon führt zu einem Abfall dieser Konzentration und könnte somit auf diese Weise eine Verringerung der Veresterungsgeschwindigkeit bewirken [96]. Andererseits hängt die Geschwindigkeit, mit der langkettige Fettsäuren oxidiert werden, von der Aktivität der Carnitinacyl-Transferase I (CAT I) ab [2, 62, 116], die für den Transport der aktivierten Fettsäuren in die Mitochondrien verantwortlich ist. Glucagon vermag die Aktivität dieses Enzyms zu steigern, indem es die Konzentration des Malonyl-CoA, eines potenten Inhibitors der CAT I, vermindert [33, 34, 109].

3. Citratzyklus versus HMG-CoA-Zyklus:

Für die Geschwindigkeit, mit der das aus der β -Oxidation stammende Acetyl-CoA im Citratzyklus oxidiert wird, soll die intramitochondriale Oxalacetatkonzentration der entscheidende Faktor sein [87, 180, 183]. Tatsächlich korreliert die Ketogenesegeschwindigkeit mit der freien Konzentration des mitochondrialen Oxalacetats [152, 153], die im Bereich der K_m der Citratsynthase liegt [114, 146, 150]. Glucagon könnte über eine Verminderung

der Oxalacetatkonzentration zu einem verminderten Einstrom von Acetyl-CoA in den Citratzyklus und dadurch zu einem vermehrten Abstrom in den HMG-CoA-Zyklus führen. Ein Absinken der Oxalacetatkonzentration könnte die Folge einer Reduktion des mitochondrialen Redoxzustandes [67, 182, 183] und/oder einer erhöhten Utilisation via Gluconeogenese [87] sein.

4. Regulation der Enzyme des HMG-CoA-Zyklus:

Acetoacetyl-CoA hemmt Enzyme des HMG-CoA-Zyklus (Acetyl-CoA Acetyltransferase [72], HMG-CoA-Synthetase [111, 129]). Da sich seine Konzentration mit dem mitochondrialen Redoxzustand ändert [74], soll dieser für die Regulation des HMG-CoA-Zyklus entscheidend sein [73, 74]. Direkte Glucagonwirkungen auf Enzyme des HMG-CoA-Zyklus sind nicht bekannt; das Hormon könnte somit die Ketogenesegeschwindigkeit lediglich indirekt über den mitochondrialen Redoxzustand beeinflussen.

An isolierten Lebern oder Hepatozyten wurde nach Glucagon eine gesteigerte Ketonkörperproduktion beobachtet [63, 101, 109, 110, 112, 191], sodaß eine Beteiligung des Hormons an der intrahepatischen Ketogeneseregulation wahrscheinlich erschien. Der Effekt wird in seiner quantitativen Bedeutung jedoch sehr unterschiedlich beschrieben [7, 63, 78, 101, 109, 110, 112, 172, 191]; er scheint von den experimentellen Bedingungen abzuhängen. Da wir in Voruntersuchungen zunächst die Ketogenese nicht durch Glucagon stimulieren konnten, war es notwendig, die Bedingungen zu definieren, unter denen Glucagon in der isolierten, perfundierten Rattenleber zu einer Ketogenesesteigerung führt. Als mögliche Variable kommen in Betracht der Ernährungszustand der Tiere und die Anwesenheit von Fettsäuren, Glucose und Glykolyseprodukten im Perfusat. Es sollte versucht werden, aus der quantitativen Betrachtung der Ketogenesestimulation unter den verschiedenen Bedingungen auf den intrahepatischen Angriffspunkt des Glucagons zu schließen.

1.3 Ziele der Arbeit

Folgende Fragen sollten in der vorgelegten Dissertation beantwortet werden:

1. Ist die Ausschüttung von Lactat plus Pyruvat in der perfundierten Rattenleber ein sicherer Indikator für den Substratdurchsatz durch die Glykolyse?
2. Wie verhalten sich die Dosis-Wirkungskurven der Glucagon-bedingten Glykolysehemmung und Glykogenolysestimulation zueinander und in Bezug zur physiologischen Glucagonkonzentration?
3. Wie sehen die Kinetiken beim Einsetzen der Glucagonwirkung auf Glykolyse und Glykogenolyse aus? Lassen sich daraus Rückschlüsse auf die Sequenz der in der Zelle ablaufenden Reaktionen ziehen?
4. Besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen der Glucagon-bedingten Hemmung der Glykolyse und Stimulation der Zellatmung?
5. Unter welchen Bedingungen läßt sich die Ketogenese in der perfundierten Rattenleber durch Glucagon stimulieren? Wo liegt der Angriffspunkt des Hormons bei der intrahepatischen Ketogeneseregulation?
6. Welche Relevanz haben die an einem Lebermodell erhobenen Befunde zu 1. bis 5. für die in vivo Situation?

Diese Fragen sollten durch Stoffwechseluntersuchungen an der isolierten, hämoglobinfrei im nicht-rezirkulierenden System perfundierten Rattenleber und durch Vergleich der eigenen experimentellen Befunde mit den Ergebnissen in der Literatur zur Kurzzeitwirkung des Glucagons beantwortet werden.

Wesentliche Teile der Ergebnisse und Diskussionen zu den Fragestellungen 1. bis 4. wurden bereits 1983 im 'European Journal of Biochemistry' veröffentlicht:

(1) Kimmig, R., Mauch, T.J., Kerzl, W., Schwabe, U., and Scholz, R. (1983)
Actions of glucagon on flux rates in perfused rat liver.

1. Kinetics of the inhibitory effect on glycolysis and the stimulatory effect on glycogenolysis.

Eur. J. Biochem. 136, 609-616.

(2) Kimmig, R., Mauch, T.J., and Scholz, R. (1983)

Actions of glucagon on flux rates in perfused rat liver.

2. Relationship between inhibition of glycolysis and stimulation of respiration by glucagon.

Eur. J. Biochem. 136, 617-620.

Zwei weitere Manuskripte mit den Ergebnissen zur Fragestellung 5. sind in Vorbereitung:

(3) Kimmig, R., Müller, B.M., Schwabe, U., and Scholz, R.

Actions of glucagon on flux rates in perfused rat liver.

3. Interaction of glycolysis and ketogenesis.

(4) Kimmig, R., Soboll, S., Schwabe, U., Müller, B.M., and Scholz, R.

Inhibition of glycolysis by fatty acid oxidation.

2 METHODIK UND ANALYTIK

2.1 Leberperfusion

2.1.1 Hämoglobinfreie Leberperfusion im nicht-rezirkulierenden System

Gustav EMDEN führte 1902 die ersten Perfusionen isolierter Lebern von Hund und Katze durch und legte damit den Grundstein zur Untersuchung von Stoffwechselvorgängen am isolierten Organ [43, 44]. Lebern von Ratten wurden jedoch erst 1941/42 von COREY und BRITTON [36] und von TROWELL [169] erstmals perfundiert. In Abwandlung der 1951 von den Arbeitsgruppen um BRAUER [15] und MILLER [113] beschriebenen Perfusionstechnik mit homologem Rattenblut verwendete SCHIMASSEK 1962 als erster zur Perfusion ein halbsynthetisches Medium, das aus einer Tyrode-Lösung mit gewaschenen Rindererythrozyten und gereinigtem Rinderserumalbumin bestand [138]. In den darauffolgenden Jahren entwickelten SCHOLZ und BÜCHER ein System der Perfusion mit hämoglobinfreiem Medium bestehend aus Krebs-Henseleit Bicarbonatpuffer mit Plasmaexpander; es gelang, die Leber allein mit physikalisch gelöstem Sauerstoff ausreichend zu versorgen, indem das Medium mit 95% O₂ gesättigt und die Leber mit einer gegenüber in situ Bedingungen 4-5fach höheren Durchströmungsrate perfundiert wurde. [139, 140]. Eine weitere entscheidende Verbesserung erfolgte 1973, als man vom geschlossenen zum offenen Perfusionssystem überging [141], d.h. zu einer Perfusion mit nicht-rezirkulierendem Medium. Dieses Perfusionssystem ist heute eine anerkannte und von vielen Arbeitskreisen angewandte Methode.

Seine Vorteile sind:

1. Im arteriellen Teil des Systems können definierte Ausgangsbedingungen hergestellt sowie definierte Veränderungen einzelner Parameter vorgenom-

men werden. Im venösen Teil finden keine Stoffwechselvorgänge statt (Enzymaustritte aus der Leber sind nur in sehr geringem Maße vorhanden [139]).

2. Aufgrund der hohen Durchströmungsgeschwindigkeit und der fehlenden Akkumulation von Metaboliten im Perfusat kann aus der Ausschüttung der Stoffwechselprodukte ins Medium auf die Geschwindigkeit intrazellulär ablaufender metabolischer Vorgänge geschlossen werden.

3. Der Sauerstoffverbrauch der Leber kann mittels Amperometrie genau bestimmt werden.

2.1.2 Perfusionsapparatur

Die von SCHOLZ und SCHALLWEG entwickelte Perfusionsapparatur (Abb. 1 und 2) wurde 1973 erstmals beschrieben [141]. Aus einem Reservoir wird das Perfusionsmedium durch eine Rollenpumpe über einen Filter in einen Diffusionsoxygenator gepumpt, in welchem es über einen Silikonkautschukschlauch (12m Länge, Durchmesser 2mm, Wandstärke 0,2mm), der um einen auf 37°C temperierten vernickelten Messingkern gewickelt ist, geleitet wird. Über den gasdurchlässigen Silikonkautschuk wird das Medium mit einem O₂/CO₂ Gemisch aufgesättigt; die Sauerstoffsättigung erreicht bei den verwendeten Flußgeschwindigkeiten von 37-43 ml/min einen Wert von annähernd 100%. Die durch die Rollenpumpe hervorgerufenen Pulsationen werden durch die Elastizität des Silikonkautschukschlauches gedämpft; auf diese Weise wird ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom hergestellt. Bevor das Perfusat durch eine V4A-Stahlkanüle über die Pfortader in die Leber eingeleitet wird, wird ihm durch Infusionspumpen die jeweilig zu infundierende Substanz in genau definierter Menge/Zeiteinheit zugesetzt. Mögliche korpuskuläre Verunreinigungen und Gasbläschen werden von einem Filter (2 Lagen Scrynel NY 85 HD)

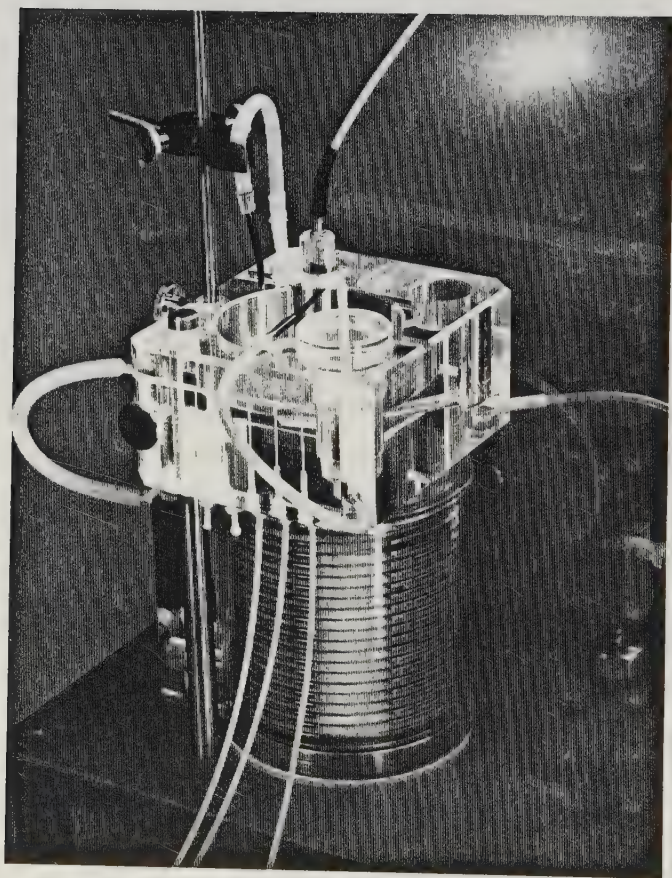


Abb. 1 Perfusionsapparatur (Erläuterungen siehe Text und Abb. 2)

zurückgehalten. Über eine in die untere Hohlvene eingebundene Kanüle wird das venöse Perfusat abgeleitet. Es passiert zunächst eine Platinelektrode zur Sauerstoffmessung, bevor es zur Analytik gesammelt wird; je nach Anforderungen der Analytik werden die Proben entweder in Erlenmeyerkolben,

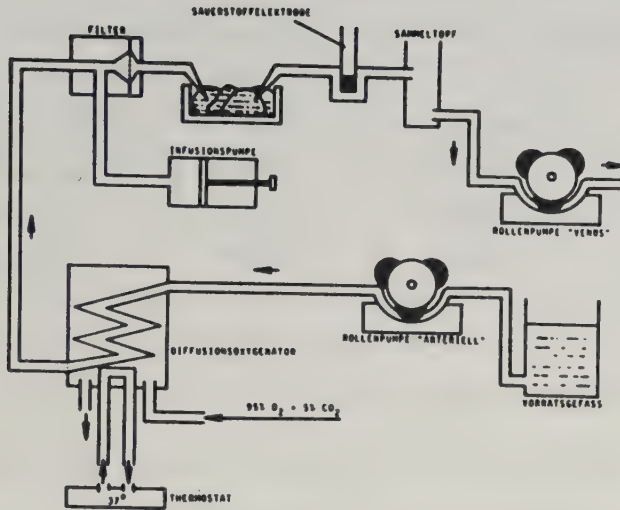


Abb. 2 Schematische Darstellung der Perfusionsapparatur (aus [16])

mittels Pipetten direkt von einem im Perfusionstisch integrierten Sammelgefäß oder mit Hilfe eines Fraktionssammlers gewonnen.

2.1.3 Perfusionslösung

Als Perfusionslösung wurde der von KREBS und HENSELEIT [89] angegebene Bicarbonatpuffer verwendet, der mit einer O_2/CO_2 Mischung (95/5 Vol%) aufgesättigt und dabei auf einen pH von 7,4 eingestellt wurde. Weitere Zusätze wurden direkt vor Eintritt des Perfusionsmediums in die Leber infundiert. Die Elektrolytzusammensetzung ist aus Tab. 1 zu ersehen.

TABELLE 1

Kationen		Anionen	
Na ⁺⁺	143,6 mmol/l	Cl ⁻	128,3 mmol/l
K ⁺	5,9 mmol/l	HCO ₃ ⁻	25,0 mmol/l
Ca ⁺⁺	2,5 mmol/l	H ₂ PO ₄ ⁻	1,2 mmol/l
Mg ⁺⁺	1,2 mmol/l	SO ₄ ⁻⁻	1,2 mmol/l

2.1.4 Versuchstiere und Operationstechnik

Für die Experimente wurden ausschließlich Lebern männlicher Wistarratten (Gewicht 170–230g) der Fa. Thomae, Biberach, verwendet. Die Tiere wurden bis zur Operation mit Altromin Standard Nahrung (Fa. Altrogge, Lage) und Wasser ad libitum ernährt. Bei Versuchen mit 'Hungerratten' wurde den Tieren 48 h vor dem Experiment die Nahrung entzogen.

Vor Operationsbeginn wurden die Ratten mit Nembutal (intraperitoneal, 5mg/100g Lebendgewicht) narkotisiert, das schnell und vollständig wieder ausgewaschen wird und somit zu keiner nennenswerten Beeinflussung des Leberstoffwechsels führt [143]. Zunächst wird das Abdomen durch einen Medianschnitt eröffnet, der Magen mobilisiert und knapp oberhalb der Kardie abgesetzt. Nach Freilegen des Leber- sowie des rechten Nierenhilus wird sodann die Vena lienalis unterbunden (unter Schonung des Ductus choledochus) und die Vena cava inferior cranial der Einmündung der Venae renales angeschlossen; zwei weitere lockere Ligaturen werden um die Vena portae hilusnah, jedoch caudal ihrer Aufzweigung in die einzelnen Leberäste gelegt. Nach zirkulärer Inzision wird bei einer Perfusionsgeschwindigkeit

von $1-2 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ eine V4A-Stahlkanüle in die Pfortader eingebunden und die Leber innerhalb weniger Sekunden entblutet; eine homogene Entfärbung der Leberlappen und das Hervortreten der braun-gelblichen Eigenfarbe sind ein Maßstab für die gleichmäßige Durchströmung aller Leberanteile. Daraufhin wird die Vena cava inferior ligiert und distal durchtrennt. Nach parasternaler Eröffnung des Thorax wird eine zweite Stahlkanüle über das rechte Herzohr bis zur Einmündung der Venae hepaticae vorgeschoben und mit zwei Ligaturen befestigt; ein Zwerchfellzipfel wird zur Zugentlastung des Gefäßsystems und zur besseren Fixation der Kanüle in die caudale Ligatur mit eingebunden. Anschließend wird die Perfusionsgeschwindigkeit auf $3 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ erhöht, die Leber aus dem Situs freipräpariert und in das dafür vorgesehene Gefäß im Perfusionstisch eingebracht. Nach Beendigung dieser ca. 10-minütigen Operation wird die Durchströmungsgeschwindigkeit auf den endgültigen Wert ($5 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$) eingestellt. Lediglich während der ca. 2 min dauernden Phase zwischen dem Einbringen der Kanülen in die Vena portae und in die Vena cava inferior ist die Leber einer Hypoxie ausgesetzt.

2.1.5 Physiologie der isolierten, sauerstoffträgerfrei perfundierten Leber

In situ wird die Leber über zwei Gefäßsysteme mit Blut versorgt: (1) mit nährstoffreichem, sauerstoffarmem Blut über die Vena portae, deren Einzugsgebiet alle unpaaren Bauchorgane bis zum proximalen Rektum umfaßt, und (2) mit sauerstoffreichem Blut über die Arteria hepatica propria aus dem Truncus coeliacus. Die Äste der Arteria hepatica propria anastomosieren im Bereich der kapillären Endstrecke (Sinusoide) mit denen der Vena portae und führen dieser ihr sauerstoffreiches Blut zu; ihr Anteil an der Leber-

durchblutung variiert zwischen 15% und 40% (siehe [139]) und ihr Beitrag zur Sauerstoffversorgung der Leber ist nach FISCHER ca. 40%-45% [47]. Eine ausreichende Arterialisierung des über die Vena portae zugeführten Perfusats ist somit aufgrund der anatomischen Gegebenheiten der hepatischen Gefäßversorgung ein vollwertiger Ersatz für die ausfallende Sauerstoffzufuhr über die Arteria hepatica propria. Die zur Gewährleistung der Sauerstoffversorgung der Leber allein mit physikalisch gelöstem Sauerstoff benötigte hohe Durchströmungsgeschwindigkeit führt zwar histologisch zu erweiterten Lebersinusoiden, jedoch zu keiner nennenswerten Funktionsstörung der hepatischen Stoffwechselfunktionen [139].

2.1.6 Durchführung der Experimente

Vor den eigentlichen Experimenten wurde eine 20-30 minütige Vorperfusionsperiode mit substrat- und wirkstofffreiem Medium geschaltet, in der sich ein stationärer metabolischer Zustand einstellte. Als Indikator für die in der Leber ablaufenden Vorgänge diente der Sauerstoffverbrauch, der nach einer anfänglichen Erhöhung nach ca. 20 min konstante Verbrauchsgeschwindigkeiten auf niedrigem Niveau erreichte. Erst dann wurde mit dem Experiment begonnen, indem entweder Substrate (z.B. Glucose) oder Wirkstoffe infundiert wurden.

Proben des ausfließenden Perfusats wurden nach Passage der Sauerstoffelektrode in Abständen von 0,5, 1 oder 2 min entnommen. Bei der Analyse von Kurzzeitkinetiken wurden dagegen Fraktionen in Abständen von 2s - 16s mittels eines Fraktionssammlers gewonnen. Es handelt sich dabei um einen durch einen Synchronmotor angetriebenen Kunststoffteller, der mehrere konzentrisch angeordnete Kränze zylindrischer Bohrungen enthält und der sich

unter dem Auslaß des Perfusats bewegt. Die Fraktionsgröße wurde durch die Umdrehungsgeschwindigkeit des Tellers und die Anordnung der Bohrungen variiert [13]. Bei Infusion diverser Hormone und Substrate wurde darauf geachtet, daß bis zur Einstellung eines neuen metabolischen Gleichgewichts immer nur ein Parameter verändert wurde, um eine eindeutige Zuordnung von Ursache und Wirkung treffen zu können.

2.2 Analytik

2.2.1 Sauerstoffmessung

Zur amperometrischen Messung des physikalisch gelösten Sauerstoffs wurde eine Platinelektrode [27] verwendet, die durch eine für Sauerstoff permeable Teflonmembran vom Perfusionsmedium abgetrennt ist. Kathode (Platin) und Anode (Ag/AgCl) sind über eine KCl-Lösung miteinander verbunden. Beim Anlegen einer Polarisationsspannung von 0,7 V ist der Reduktionsstrom, der bei der Elektronenaufnahme des auf die Kathode auftreffenden Sauerstoffs entsteht, der Sauerstoffkonzentration proportional. Zur Eichung, die vor und nach jedem Experiment durchgeführt wurde, wird das Perfusat mit verschiedenen Gasgemischen aufgesättigt ($O_2/CO_2 = 95/5$ Vol%, Luft, mittels Dithionit von Sauerstoff befreite Lösung). Die venöse Sauerstoffkonzentration wurde während jedes Versuchs kontinuierlich gemessen. Die Atmungsgröße der Leber läßt sich dann folgendermaßen beschreiben:

$$\text{Atmungsgröße} = \frac{AVD \times a \times D}{1013 \times M \times FG} \quad \mu\text{Mol } O_2 \times \text{min}^{-1} \times g^{-1}$$

AVD = Arteriovenöse Differenz der Sauerstoffkonzentrationen in mM

a = Bunsen'scher Absorptionskoeffizient = 0,023 ml O₂ gelöst in 0,9% NaCl bei 1013 mbar, 37°C

D = Durchströmungsgeschwindigkeit der Leber in ml x min⁻¹

M = Molvolumen: 22,4 x 10⁻³ ml pro μMol

FG = Feuchtgewicht der Leber in g

2.2.2 Metabolitbestimmung

In den Proben des ausfließenden Perfusats wurden Glucose, Lactat, Pyruvat, Acetoacetat, 3-Hydroxybutyrat, Ammoniak und Harnstoff gemessen. Die Bestimmung erfolgte mit der Methode des optischen Tests, die auf der unterschiedlichen Lichtabsorption der oxidierten und reduzierten Pyridinnukleotide im ultravioletten Bereich beruht [179]. Durch Kopplung der Meßreaktion mit einer geeigneten Pyridinnukleotid-abhängigen Indikatorreaktion kann so die Konzentration der ins Perfusionsmedium abgegebenen Metabolite über die Extinktionsänderung im enzymatischen Ansatz berechnet werden. Das Prinzip der einzelnen Tests ist im Handbuch "Methoden der enzymatischen Analyse" von BERGMAYER beschrieben [6]. Die Testansätze wurden zur Anpassung an die jeweils vorhandenen experimentellen Bedingungen entsprechend modifiziert. Die metabolischen Flußgeschwindigkeiten wurden aus der arteriovenösen (genauer: portocavalen) Konzentrationsdifferenz und der während eines Experiments konstant gehaltenen Perfusionsgeschwindigkeit ermittelt und auf 25 g Körpergewicht der Ratte bezogen. Da 25 g Körpergewicht ca. 1 g Leberfeuchtgewicht entsprechen, werden die so ermittelten Geschwindigkeiten pro g Leberfeuchtgewicht angegeben (μMol x min⁻¹ x g⁻¹).

2.2.3 $^{14}\text{CO}_2$ -Messung im Perfusat

Bei Versuchen mit radioaktiv markierten Substanzen wurde das venöse Perfusat nach Passage der Sauerstoffelektrode in 30 s, 60 s und 120 s Fraktionen in Enghals-Erlenmeyerkolben (250 ml) aufgefangen und nach Probeentnahme sofort mit einem Gummistopfen dicht verschlossen. Durch zwei im Stopfen befindliche Bohrungen waren ein Silikonschlauch und ein Draht geführt, der zur Aufhängung eines zur CO_2 -Absorption mit 1 ml Phenyläthylamin gefüllten Plastikgefäßes diente. Über den Silikonschlauch wurden 1 M HCl (ca. 0,2 ml pro 10 ml Perfusat) zugegeben, um das gelöste CO_2 auszutreiben. Die Kapazität des CO_2 -Absorptionssystems war ausreichend, um das gesamte im Perfusat vorhandene CO_2 aufzunehmen; nach 24h war es vollständig in Phenyläthylammoniumcarbonat übergeführt [16]. Die darin enthaltene Radioaktivität wurde nach Auflösung des Phenyläthylamins (bzw. seines Carbonats) in 10 ml einer Szintillationsflüssigkeit gemessen. Unter Berücksichtigung der spezifischen Radioaktivität des jeweiligen Substrats im arteriellen Perfusat wurde die Geschwindigkeit der CO_2 -Bildung errechnet und als $\mu\text{mol CO}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ angegeben.

2.2.4 Isolierung von Glucose und Lactat durch Säulenchromatographie

Zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität von Glucose und Lactat im venösen Perfusat wurden diese Metaboliten über Ionenaustauschchromatographie [22] von anderen - ebenfalls radioaktiv markierten - Stoffwechselprodukten abgetrennt und nach enzymatischer Konzentrationsbestimmung im Eluat ein definiertes Volumen zur Radioaktivitätsmessung mit Szintillationsflüssigkeit gemischt. Lactat wurde über eine mit Anionenaustauscherharz (Dowex 1X8, 200-400; Formiatform) gefüllte Säule (Länge 30 cm, Innendurchmesser

1 cm) isoliert: nach Auftragen von 20 ml Perfusat wurde zunächst mit 100 ml bidestilliertem Wasser die Glucose ausgewaschen, bevor durch Elution mit 0,6 N Ameisensäure das Lactat fraktioniert gewonnen wurde. Zur Isolierung der Glucose wurde die bei der Anionenaustauscherchromatographie gewonnene Glucosefraktion über eine zweite Säule mit Kationenaustauscherharz (Dowex 50WX2, 200-400; H^+ -Form) geschickt und wiederum mit 100 ml bidestilliertem Wasser eluiert. In den jeweiligen Peakfraktionen wurde die Radioaktivität und die Metabolitkonzentration bestimmt und daraus die spezifische Radioaktivität berechnet.

2.2.5 Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie

Das zu untersuchende Probenmaterial wurde mit jeweils 10 ml der Szintillationsflüssigkeit homogen vermischt. Die darin enthaltene Radioaktivität wurde 10 min lang in einem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer, Beckmann, Modell LS 7500, gemessen. Vor jeder Zählung wurde der Nullwert des Szintillationsmediums ermittelt; außerdem wurde mit Hilfe der Beckmann H-Nummer [68] der Quenchwert der Proben kontrolliert; da dieser aber während eines Experimentes sowohl in den Proben des einfließenden als auch des ausfließenden Perfusats konstant war, wurde auf die Umrechnung der gemessenen Zerfälle (cpm) in die tatsächlich erfolgten Zerfälle (dpm) verzichtet. Als Szintillationssystem wurde ein Toluolansatz folgender Zusammensetzung verwendet:

2700 ml	Toluol
1266 ml	2-Methoxyäthanol (Cellusolve)
254 ml	Äthanol
700 mg	1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-Benzol (POPOP)
11.6 g	2,5-Diphenyloxazol (PPO)

2.3 Materialien

Alle Enzyme und Coenzyme stammen von Boehringer, Mannheim; die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Merck, Darmstadt oder Roth, Karlsruhe bezogen. Glucagon (Glucagon Novo 1 mg; Reg.Nr. G 392-1) wurde von der Fa. Novo Industrie GmbH, Mainz erhalten, wohingegen alle verwendeten Radiochemikalien von Amersham-Buchler, Braunschweig bezogen wurden. Die für die Leberperfusionen verwendeten Apparaturen (einschließlich Fraktionssammler, Infusionspumpen und Teilen der Sauerstoffmeßvorrichtung) wurden in den Werkstätten des Instituts für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians Universität München konstruiert und gebaut.

2.4 Enzyme und Abkürzungen

Acetyl-CoA Acetyltransferase oder Acetyl-CoA:acetyl-CoA C-acetyltransferase (EC 2.3.1.9)

Acetyl-CoA Carboxylase oder Acetyl-CoA:carbon-dioxide ligase (ADP-forming) (EC 6.4.1.2)

Aldolase oder D-Fructose-1,6-bisphosphate D-glyceraldehyde-3-phosphate-lyase (EC 4.1.2.13)

Carnitinacyltransferase; CAT I und CAT II oder Palmitoyl-CoA:L-carnitine O-palmitoyltransferase (EC 2.3.1.21)

Citratsynthase oder Citrate oxaloacetate lyase ($\text{pro-3S-CH}_2\text{COO}^- \rightarrow \text{acetyl-CoA}$) (EC 4.1.3.7)

Cyclase oder ATP pyrophosphate-lyase (cyclizing) (EC 4.6.1.1)

Cyclo-AMP-abhängige Proteinkinase; Proteinkinase oder ATP:protein phosphotransferase (EC 2.7.1.37)

Fructose-1,6-Bisphosphat-Phosphatase; FB Pase 1 oder D-Fructose-1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase (EC 3.1.3.11)

Fructose-2,6-Bisphosphat-Phosphatase; FB Pase 2 oder D-Fructose-2,6-bisphosphate 2-phosphohydrolase (EC 3.1.3.-)

Glykogenphosphorylase (a/b); GP oder α -1,4-D-Glucan:orthophosphate α -D-glucosyltransferase (EC 2.4.1.1)

Glykogenphosphorylase-Phosphatase; Phosphorylase-Phosphatase oder Phosphorylase α phosphohydrolase (EC 3.1.3.17)

Glykogensynthetase; GS oder UDPglucose:glycogen 4- α -D-glucosyltransferase (2.4.1.11)

Glykogensynthetase-Phosphatase oder [UDPglucose-glycogen glycosyltransferase D] phosphohydrolase (EC 3.1.3.42)

3-Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthetase; HMG-CoA-Synthetase oder 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA acetoacetyl-CoA-lyase (CoA-acetylatend) (EC 4.1.3.5)

Lactatdehydrogenase; LDH oder L-Lactate:NAD⁺ oxidoreductase (EC 1.1.1.27)

Lipase oder Triacylglycerol acylhydrolase (EC 3.1.1.3)

Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; PEPCK oder GTP-oxaloacetate carboxy-lyase (transphosphorylatend) (EC 4.1.1.32)

Phosphofruktokinase; 6-Phosphofructo 1-Kinase; PFK 1 oder ATP:D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase (EC 2.7.1.11)

Phosphofruktokinase 2; 6-Phosphofructo 2-Kinase; PFK 2 oder ATP:D-fructose-6-phosphate 2-phosphotransferase (2.7.1.-)

Pyruvatcarboxylase; PC oder Pyruvate:carbon-dioxide ligase (ADP-forming) (EC 6.4.1.1)

Pyruvatdehydrogenase; PDH oder Pyruvate:lipoate oxidoreductase (decarboxylatend and acceptor-acetylatend) (EC 1.2.4.1)

Pyruvatkinase; PK oder ATP:pyruvate 2-O-phosphotransferase (EC 2.7.1.40)

Abkürzungen:

AMP/ATP	oder	Adenosin-5'-Monophosphat/Adenosin-5'-Triphosphat
Cyclo-AMP	oder	Adenosin-3',5'-Monophosphat
Fru-6-P	oder	Fructose-6-Phosphat
Fru(1,6)P ₂	oder	Fructose-1,6-Bisphosphat
Fru(2,6)P ₂	oder	Fructose-2,6-Bisphosphat
G-1-P/G-6-P	oder	Glucose-1-Phosphat/Glucose-6-Phosphat
HMG-CoA; CoA	oder	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A; Coenzym A
NAD ⁺ /NADH	oder	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (+ H ⁻)

3 ERGEBNISSE

3.1 Lactat- plus Pyruvatproduktion als Maß für den glykolytischen Fluß

Lactat und Pyruvat, die Endprodukte der Glykolyse, werden durch einen spezifischen Monocarboxylat-Carrier über die Plasmamembran der Leberzelle mit einer Geschwindigkeit transportiert, die mindestens eine Größenordnung über ihrer intrazellulären Bildungsgeschwindigkeit liegt (für L-Lactat etwa $120 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$) [12, 144]). Da im System der nicht-rezirkulierend perfundierten Rattenleber keine Akkumulation von Stoffwechselprodukten stattfindet, ist anzunehmen, daß die beiden Metabolite, sofern sie im arteriellen Perfusat nicht enthalten sind - ihrem hohen intra-/extrazellulären Konzentrationsgefälle entsprechend - mit der Geschwindigkeit ins Medium übertreten, mit der sie zytosolisch gebildet werden (es fehlt in diesem System die Einstellung eines Gleichgewichts oder, anders ausgedrückt, die Rückreaktion). Die unter diesen Bedingungen im Gegensatz zum geschlossenen System [139] auftretenden hohen Glykolyseraten eignen sich folglich zum Studium der Glykolyse regulation. Aufgrund der Metabolisierung intrazellulär gebildeten Pyruvats dürften jedoch, wie KERZEL [79] bereits vermutete, die tatsächlichen glykolytischen Flußraten höher sein, als die gemessene Geschwindigkeit der Lactat- und Pyruvatausschüttung ins Medium. Der Fehler bei der Bestimmung des glykolytischen Flusses allein aus der Geschwindigkeit der Abgabe von Lactat und Pyruvat ins Medium läßt sich durch Ermittlung der Metabolisierungsraten von Pyruvat über Oxidation, Gluconeogenese, Aminosäurensynthese und Lipogenese abschätzen.

3.1.1 Pyruvatoxidation

Zur Erfassung des Anteils des glykolytischen Flusses, der in die Pyruvatoxidation einmündet, wurden Lebern gefütterter Ratten mit verschiedenen Konzentrationen [$U-^{14}C$]-markierter Glucose perfundiert. Lactat und Pyruvat wurden bei diesen Lebern nicht nur aus exogenem Substrat (Glucose) sondern auch aus dem gespeicherten Glykogen gebildet (Tab. 2). Wenn unter aeroben Verhältnissen Pyruvat, das aus [$U-^{14}C$]Glucose entstanden ist, oxidiert wird, wird zunächst in der Pyruvatdehydrogenasereaktion $^{14}CO_2$ abgespalten und das dabei entstandene Acetyl-CoA im Citratzyklus - ebenfalls unter Bildung von $^{14}CO_2$ - oxidiert. Die Produktion von $^{14}CO_2$ allein ist jedoch kein genaues Maß für die Pyruvatoxidation, da die Radioaktivität im Pyruvat durch Glykogenolyse und Aminosäurenkatabolismus verdünnt wird. Aus den spezifischen Radioaktivitäten von Glucose als Substrat und Lactat als Produkt läßt sich jedoch die Verdünnung der Radioaktivität des intrazellulären Pyruvatpools in erster Näherung bestimmen [16]. Wenn man also die Radioaktivität von $^{14}CO_2$ auf der Grundlage der spezifischen Radioaktivität des Lactats quantifiziert, wird die gesamte Pyruvatoxidation erfaßt und nicht nur der aus exogener Glucose stammende Anteil. Obwohl der so ermittelte Wert für die Geschwindigkeit der Pyruvatoxidation eine gute Näherung darstellt, besteht aber immer noch die Möglichkeit von Fehlern bedingt durch eine $^{14}CO_2$ -Produktion aus [$U-^{14}C$]Glucose im Pentosephosphatweg und durch den Einbau von Acetyl-CoA in andere Metabolite z.B. in der Lipogenese. Beide Fehler sind einander entgegengerichtet; sie scheinen jedoch gering zu sein, denn es wurde gezeigt, daß unter diesen Bedingungen die Aktivität des Pentosephosphatwegs sehr klein ist im Vergleich zum Glykolysefluß [90] und daß der Einbau von Radioaktivität in Lipide verschwindend gering ist (weniger als $0,01 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$; T. Mauch, unveröffent-

Table 1. Rates of CO_2 production, oxygen consumption and glycolysis in a liver perfused with glucose and glucagon. The liver from a fed rat was perfused with Krebs-Henseleit bicarbonate buffer in a non-recirculating system. [^{14}C]Glucose was added by stepwise increasing concentrations (2 mM, 10 mM, 35 mM), 20 min at each step. At 35 mM glucose, glucagon (10 nM) was infused for 20 min. Concentrations of oxygen, lactate and pyruvate were measured in the effluent perfusate (for calculation of metabolic rates see Materials and Methods). The radioactivity in perfusate lactate was analyzed and referred to the specific radioactivity of glucose (≈ 1.00) in the arterial perfusate (see values in parentheses). The production of $^{14}\text{CO}_2$ was expressed either as CO_2 production from glucose (A, radioactivity/6 $\times$ specific radioactivity of glucose) or as CO_2 production from pyruvate (B, radioactivity/3 $\times$ specific radioactivity of lactate in the effluent perfusate). The calculation of CO_2 production from pyruvate was based on the assumption that the specific radioactivity of perfusate lactate is a valid indicator for the intracellular pyruvate pool (i.e. for the dilution of radioactivity in the hexophosphate pool due to glycogen breakdown). From total (i.e. measured) oxygen consumption (C), 30% were subtracted as due to cyanide-insensitive respiration for extramitochondrial oxygen-consuming processes [37] (D). Oxygen was required for the oxidation of glycolytic NADH generated in the production of that portion of pyruvate which was released into the perfusate (E, pyruvate released into the perfusate/2). The remaining oxygen consumption was taken as a measure for the maximum possible rate of pyruvate oxidation (F) assuming that fatty acid oxidation is absent. For better comparison with rates of CO_2 production and oxygen consumption, the rates of lactate plus pyruvate release are expressed as C_1 units (G). The glycolytic flux (C_1 units) is either B + G as a minimum or $1.2 \times \text{F}$ (since 2.5 mol O_2 are consumed when 1 mol pyruvate is converted into 3 mol CO_2) plus G as a maximum. The values are the mean of each 20-min period

Parameter	Value at glucose concn of				
	0	2 mM (0.03)	10 mM (0.21)	35 mM (0.49)	35 mM + glucagon (0.29)
$\mu\text{mol C}_1 \text{ units or } \text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$					
CO_2 production:					
from glucose (A)	-	0.04	0.34	0.79	0.54
from pyruvate (B)	-	0.78	0.84	0.84	0.90
O_2 consumption:					
measured (C)	2.00	2.06	2.14	2.09	2.65
cyanide-sensitive (D)	1.4	1.5	1.5	1.5	2.1
for oxidation of cytosolic NADH (E)	-	0.2	0.2	0.4	0.2
for pyruvate oxidation (F)	1.2	1.3	1.3	1.1	1.9
Release of lactate plus pyruvate (G)	5.1	5.1	6.3	11.4	4.5
Glycolytic flux:					
B+G (H)	-	5.9	7.1	12.2	5.4
1.2 F+G (I)	6.5	6.7	7.9	12.7	6.8

Tabelle 2 (entnommen aus [82])

* Error; should read:

(A, radioactivity/specific radioactivity of glucose $\times 6$);

(B, radioactivity/specific radioactivity of lactate in the effluent perfusate $\times 3$).

Legende zu Tabelle 2.

CO₂-Produktion, Sauerstoffverbrauch und Glykolyse in einer mit Glucose und Glucagon perfundierten Leber einer gefütterten Ratte

Die Leber einer gefütterten Ratte wurde mit Krebs-Henseleit Bicarbonatpuffer in einem nicht-rezirkulierenden System perfundiert. [U-¹⁴C]Glucose wurde in schrittweise ansteigenden Konzentrationen (2, 10, 35 mM) für jeweils 20 min infundiert. Bei 35 mM Glucose wurde Glucagon (10 nM) für 20 min gegeben. Die Konzentrationen von Sauerstoff, ¹⁴CO₂, Lactat und Pyruvat wurden im venösen Perfusat gemessen (Analyse siehe Kap. 2). Die Radioaktivität des venösen Lactats wurde bestimmt und auf die spezifische Radioaktivität der arteriellen Glucose (= 1,00) bezogen (Werte in Klammern). Aus der ¹⁴CO₂-Produktion wurde die CO₂-Produktion aus Glucose (A, Radioaktivität des venösen Lactats : Spezifische Radioaktivität der Glucose x 6) und aus Pyruvat (B, Radioaktivität des ¹⁴CO₂ : Spezifische Radioaktivität des venösen Lactats x 3) bestimmt. Die Berechnung der CO₂-Produktion aus Pyruvat geht von der Annahme aus, daß die spezifische Radioaktivität des venösen Lactats ein verlässlicher Indikator für den intrazellulären Pyruvatpool ist (z.B. für die Verdünnung der Radioaktivität im Hexosephosphatpool infolge gesteigerten Glykogenabbaus).

Von dem gemessenen Sauerstoffverbrauch (C) wurden zunächst 30% für den Cyanid-insensitiven Anteil der Atmung subtrahiert, der auf extramitochondriale Sauerstoff-verbrauchende Prozesse zurückzuführen ist [167] (D). Sauerstoff wurde außerdem für die Oxidation von in der Glykolyse gebildetem NADH verbraucht, das bei der Bildung des ins Perfusat abgegebenen Pyruvats anfiel (E, venöses Pyruvat:2). Der verbleibende Anteil des Sauerstoffverbrauchs wurde als Maß für die maximal mögliche Pyruvatoxidation (F) verwendet, indem unterstellt wurde, daß keine Fettsäureoxidation vorhanden ist. Zum besseren Vergleich mit der der ¹⁴CO₂-Produktion und dem Sauerstoffverbrauch wurde die Lactat- plus Pyruvatproduktion in Ci-Einheiten angegeben (G). Der "tatsächliche" Glykolysefluß (Ci-Einheiten) kann nun einerseits als Summe von B und G, andererseits als $1,2 \times F$ (da bei der Produktion von 3 Mol CO₂ aus Pyruvat 2,5 Mol O₂ verbraucht werden) berechnet werden. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte der jeweils am Ende einer 20 min Periode gemessenen Geschwindigkeiten.

lichte Resultate). Auch die Abgabe von Aminosäuren ins Medium ist unter diesen Bedingungen geringer als $0,1 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ (überwiegend Alanin) und diese stammen zum größten Teil aus der Proteolyse [195].

In Tab. 2 sind die Ergebnisse eines Experiments beschrieben, bei dem die Leber einer gefütterten Ratte mit schrittweise ansteigenden Konzentrationen [U-¹⁴C]-markierter Glucose perfundiert wurde. Die Geschwindigkeit der ¹⁴CO₂-Produktion aus Pyruvat (Tab. 2, B; Berechnung siehe Legende Tab. 2)

war bei Glucosekonzentrationen von 2 mM - 35 mM konstant und wurde auch durch Glucagongabe (10 nM; 35 mM Glucose) nicht beeinflusst; sie entsprach einer Pyruvatoxidation von ca. $0,85 \mu\text{Mol } C_1\text{-Einheiten} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$. Unter den verschiedenen Bedingungen läßt sich daraus ein Anteil am gesamten glykolytischen Fluß zwischen 7% (35 mM Glucose; Tab. 2, B geteilt durch H) und 13% (2 mM Glucose; Tab. 2, B:H) bzw. 17% (35 mM Glucose + 10 nM Glucagon; Tab. 2, B:H) errechnen.

Die Geschwindigkeit der Pyruvatoxidation kann auch aus dem Sauerstoffverbrauch der Leber abgeschätzt werden. Die erforderlichen Berechnungen sind in der Legende zu Tab. 2 beschrieben. Die auf diese Weise ermittelten Werte für die Pyruvatoxidation betragen zwischen $1,1 - 1,3 \mu\text{Mol } C_1\text{-Einheiten} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ (2, 10, 35 mM Glucose, F) und $1,9 \mu\text{Mol } C_1\text{-Einheiten} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ (35 mM Glucose + 10 nM Glucagon, F); sie würden etwa 15-25% des jeweiligen glykolytischen Flusses entsprechen. Die so errechneten Werte sind jedoch etwas höher als die mit der Markierungsmethode ermittelten; dies ist jedoch leicht zu erklären, wenn man bedenkt, daß die Berechnung der Pyruvatoxidation aus dem Sauerstoffverbrauch der Leber voraussetzt, daß Pyruvat unter diesen Bedingungen das einzige oxidierte Substrat ist. Diese Werte geben somit die für den jeweiligen Sauerstoffverbrauch maximal mögliche Pyruvatoxidation an.

Der glykolytische Fluß ist also unter Berücksichtigung der Pyruvatoxidation maximal um 10-20% größer als aufgrund der Lactat- plus Pyruvatausschüttung angenommen wurde (vergleiche H und I mit G in Tab. 2). Unter Glucagon nimmt trotz Steigerung des Sauerstoffverbrauchs die CO_2 -Produktion aus Glucose und Pyruvat (Tab 2; A,B) nicht zu; die zur Steigerung des Sauerstoffverbrauchs benötigten Reduktionsäquivalente können somit nicht

einer erhöhten Pyruvatoxidation zugeschrieben werden, sondern müssen aus anderen katabolen Stoffwechselprozessen stammen, z.B. aus der Fettsäureoxidation.

3.1.2 Gluconeogenese

Es besteht die Möglichkeit, daß das in den periportalen Zellen entstandene Lactat plus Pyruvat dort oder in den perivenösen Zellen eines Sinusoids durch Gluconeogenese wieder zu Glucose resynthetisiert wird. Der tatsächliche Glykolysefluß wäre dann größer als die Lactat- plus Pyruvatausschüttung. Aufgrund der Zonierung der Leberläppchen [127] in periportale Zellen mit vorwiegender Gluconeogenese und perivenöse Zellen, die vorwiegend glykolisieren sollen [58, 137], erscheint ein quantitativ bedeutendes Recycling unwahrscheinlich. Dennoch wurde dieser Frage experimentell nachgegangen.

Die Geschwindigkeit der Gluconeogenese wurde in Lebern gefütterter und gehungerter Ratten über die Einbaugeschwindigkeit von radioaktiv markiertem [^{14}C]Bicarbonat in Glucose untersucht. In der Pyruvatcarboxylase-Reaktion wird CO_2 an Pyruvat fixiert; es entsteht Oxalacetat das zunächst in Stellung 4 radioaktiv markiert ist. Oxalacetat steht über Malat mit Fumarat im Gleichgewicht, sodaß es über diesen Weg zu einer gleichmäßigen Verteilung der Radioaktivität auf die C-Atome in Stellung 1 und 4 des Oxalacetats kommt. In der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Reaktion wird CO_2 wieder abgespalten, das jedoch nur noch die Hälfte der ursprünglichen Radioaktivität enthält. Die andere Hälfte bleibt im Phosphoenolpyruvat fixiert und kann via Gluconeogenese in Glucose eingebaut werden.

Berechnungen und Ergebnisse der Versuche sind in Tab. 3 wiedergegeben. In mit [^{14}C]Bicarbonat, substratfrei perfundierten Lebern gefütterter Ratten betrug die Gluconeogenese $0,08 \mu\text{Mol } \text{C}_1\text{-Einheiten} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ bei einer Lactat- plus Pyruvatproduktion von $3,45 \mu\text{Mol } \text{C}_1\text{-Einheiten} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ (ca 2% der Glykolyserate), stieg jedoch in Anwesenheit von Glucagon auf $0,49 \mu\text{Mol } \text{C}_1\text{-Einheiten} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ bei $1,59 \mu\text{Mol } \text{C}_1\text{-Einheiten} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ (ca. 24% der Glykolyserate) an. Bei Lebern gehungerter Tiere wurde 35 mM Glucose als Substrat infundiert; die von vorneherein höhere Gluconeogeneserate ($0,26 \mu\text{Mol } \text{C}_1\text{-Einheiten} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$; ca. 12% der Glykolyserate) ließ sich vorübergehend deutlich stimulieren, um dann aber - nach 10 min Glucagoninfusion - bei vollständiger Hemmung der Lactat- und Pyruvatausschüttung einen Wert anzunehmen, der nur wenig über dem Ausgangswert lag (Tab. 3). Dieses Phänomen läßt sich wahrscheinlich auf einen Mangel an Substrat (Lactat und Pyruvat) infolge der ausgeprägten Glykolysehemmung durch Glucagon zurückführen. Einschränkend muß gesagt werden, daß die Anzahl der pro gebildetem Glucosemolekül in der Gluconeogenese eingebauten ^{14}C -Atome, die theoretisch 1 betragen müßte, experimentell zwischen 0,8 und 1,2 schwankt; diese Diskrepanz ist möglicherweise mit dem im Zusammenhang mit der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase beschriebenen "futile cycle" zu erklären [136]; auf die Problematik dieser Methode zur Erfassung der Gluconeogenesegeschwindigkeit wurde in [196] näher eingegangen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die tatsächliche Glykolysegeschwindigkeit beim gefütterten Tier aufgrund der Pyruvatoxidation maximal etwa 10 - 20% über der gemessenen Lactat- plus Pyruvatausschüttung liegt. Die Gluconeogenese ist unter Kontrollbedingungen vernachlässigbar gering. Glucagon beeinflusst die Geschwindigkeit der Pyruvatoxidation nicht, führt je-

Table 2. *Incorporation of $^{14}\text{CO}_2$ into glucose in the presence and absence of glucagon*
 The livers from a fed and a 48-h-fasted rat were perfused with Krebs-Henseleit bicarbonate buffer, either substrate-free (fed, upper part) or containing 35 mM glucose (fasted, lower part) as described in Fig. 1. Sodium [^{14}C]bicarbonate (0.1 $\mu\text{Ci/ml}$) was infused into the perfusate starting 6 min before glucagon infusion. (Isotopic equilibrium with the pool of intermediates of gluconeogenesis is reached within 3 min; G. Mülhofer, personal communication). Glucagon (final concentration 10 nM) was infused for 10 min after a 30-min pre-perfusion period. The perfusate was sampled in 1-min fractions and analyzed for glucose, lactate, pyruvate and the radioactivity trapped in phenylethylamine as described in Materials and Methods. The incorporation of radioactivity into glucose was determined following isolation of glucose by ion-exchange chromatography in that the radioactivity found in glucose was divided by the specific activity of the arterial bicarbonate. The amount of $^{14}\text{CO}_2$ incorporated into glucose represents the amount of glucose synthesized from pyruvate via gluconeogenesis. The table summarizes the data obtained immediately before and after 3 min and 10 min of glucagon infusion

Nutritional state	Glucose concn mM	Glucagon concn nM	Time of infusion min	Lactate plus pyruvate production $\mu\text{mol C}_1 \text{ units} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$	$^{14}\text{CO}_2$ incorporation into glucose $\mu\text{mol C}_1 \text{ units} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$
Fed	0	0	-	3.45	0.08
	0	10	3	4.35	0.28
	0	10	10	1.59	0.49
Fasted	35	0	-	1.92	0.26
	35	10	3	1.32	0.51
	35	10	10	0.06	0.39

Legende zu Tabelle 3.

$^{14}\text{CO}_2$ -Einbau in Glucose in An- und Abwesenheit von Glucagon

Die Lebern einer gefütterten und einer 48 h gehungerten Ratte wurden, wie in Abb. 3 beschrieben, mit Krebs-Henseleit Bicarbonatpuffer perfundiert, entweder substratfrei (gefüttertes Tier, oben) oder mit 35 mM Glucose (gehungertes Tier, unten). 6 min vor Beginn der Glucagoninfusion wurde mit der Infusion von $\text{Na}[^{14}\text{C}]\text{Bicarbonat}$ ($0,1 \mu\text{Ci/ml}$) begonnen (Ein Isotopen-äquilibrium mit Intermediaten der Gluconeogenese wird nach 3 min erreicht; G. Müllhofer, persönliche Auskunft). Glucagon (10 nM) wurde nach einer 30 min Vorperfusionsperiode für 10 min infundiert. Das venöse Perfusat wurde in 1 min Fraktionen gesammelt und entsprechend der in Kap. 2 besprochenen Methoden auf Glucose, Lactat und Pyruvat analysiert. Der $^{14}\text{CO}_2$ -Einbau in Glucose wurde nach Messung der inkorporierten Radioaktivität nach Isolierung der Glucose durch Ionenaustauschchromatographie ermittelt, indem die eingebaute Radioaktivität durch die spezifische Radioaktivität des arteriellen Bicarbonats geteilt wurde. Die Menge des eingebauten $^{14}\text{CO}_2$ entspricht quantitativ der Menge der aus Pyruvat via Gluconeogenese synthetisierten Glucose. In der Tabelle sind die Ergebnisse jeweils kurz vor sowie 3 min und 10 min nach Beginn der Glucagoninfusion gezeigt.

doch zu einem Anstieg der Gluconeogenese, die dann etwa 25% des glykolytischen Restflusses beträgt. Der Pyruvatmetabolismus über Aminosäuresynthese und Lipogenese kann vernachlässigt werden. Die später gezeigte Hemmung der Glykolyse durch Glucagon kann nicht durch eine gesteigerte Pyruvatoxidation und nur zu etwa 20% mit einer Steigerung des Recyclings (Gluconeogenese) des entstandenen Lactats plus Pyruvats erklärt werden.

3.2 Glucagonwirkung auf Glykogenolyse und Glykolyse

3.2.1 Stimulation der Glykogenolyse und Hemmung der Glykolyse mit Glykogen als Substrat durch Glucagon

Der zeitliche Verlauf von Geschwindigkeitsänderungen metabolischer Vorgänge in einem Perfusionsexperiment mit der Leber einer gefütterten Ratte ist in Abb. 3 dargestellt. Als Parameter für die Glykogenolyse wird die Glucoseausschüttung der Leber, als Maß für die Glykolyse die Lactat- plus Pyruvatausschüttung gezeigt. Bei substratfreier Perfusion erhält die Leber allein durch Glykogenolyse Substrat für die Glykolyse; da folglich ein Teil der aus der Glykogenolyse stammenden Glucose über die Glykolyse zu Lactat und Pyruvat abgebaut wird, wird die Glykogenolyse genauer durch die Summe Glucose + 0,5 Lactat + 0,5 Pyruvat beschrieben (1 Molekül Glucose entspricht 2 Molekülen Lactat oder Pyruvat). Unter Kontrollbedingungen betrug der Glucoseabbau via Glykolyse etwa $1 \mu\text{Mol C}_6\text{-Einheiten} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$; zusätzlich wurden ca. $1,4 \mu\text{Mol C}_6\text{-Einheiten} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ als Glucose ins Medium abgegeben; daraus ergibt sich eine Glykogenolyserate von etwa $2,4 \mu\text{Mol C}_6\text{-Einheiten} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$. Unter der Annahme eines Glykogengehalts der Leber einer gefütterten Ratte von 200 - 300 $\mu\text{Mol Glucoseeinheiten} \times \text{g}^{-1}$ könnte diese Glykogenolysegeschwindigkeit unter den Bedingungen der Perfusion für ca. 100 min beibehalten werden, bevor die Glykogenreserven erschöpft sind. Man kann deshalb annehmen, daß ein Experiment von 70 min Dauer nicht entscheidend durch Mangel an Glykogen beeinflusst wird, obwohl eine Limitierung nicht zu übersehen ist (siehe Abfall der Basislinie in der Glykogenolyse von 20 min bis 70 min, der ca. $0,01 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ pro min bzw. 0,5% pro min entspricht).

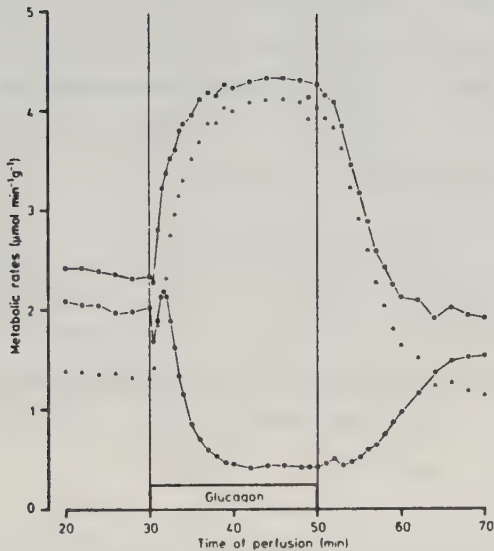


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der Glucagonwirkung auf Glykogenolyse, Glucoseausschüttung und Glykolyse in der substratfrei perfundierten Leber einer gefütterten Ratte

Die Leber einer gefütterten Ratte wurde mit substratfreiem Krebs-Henseleit Bicarbonatpuffer im nicht-rezirkulierenden System perfundiert. Glucagon (10 nM) wurde von min 30 - 50 der Perfusion infundiert. Das venöse Perfusat wurde in 0,5, 1 und 2 min Abstand gesammelt; die Geschwindigkeiten der Glykolyse (Lactat- plus Pyruvatausschüttung, ●), Glucoseausschüttung (▲) und Glykogenolyse (Glucose plus 1/2 Lactat plus 1/2 Pyruvat, ■) wurden aus der Geschwindigkeit der Ausschüttung von Glucose, Lactat und Pyruvat errechnet und auf das Leberfeuchtgewicht bezogen ($\mu\text{Mol/min} \times \text{g}$).

Nach 30 min Perfusionsdauer wurde Glucagon (Endkonzentration 10 nM) infundiert. Wie in Abb. 3 zu erkennen ist, stieg die Glykogenolyse bereits nach 30 s an; sie erreichte nach etwa 10 min mit einer Verdopplung der Aus-

gangsgeschwindigkeit ihr Maximum. Die Änderungen in der Glykolysegeschwindigkeit zeigen eine komplexe Kinetik. Nach initialer Hemmung, die noch vor dem Beginn der Glykogenolysesteigerung lag, kam es zu einem vorübergehenden Anstieg bevor die Glykolyse innerhalb von 10 min auf etwa 20% des Ausgangswerts abfiel. Beide Kinetiken werden später in Experimenten mit erheblich feinerer Zeitauflösung analysiert.

Nach 20 min Glucagoneinwirkung wurde die Infusion beendet. Die Stimulation der Glykogenolyse ließ sofort nach, obwohl ein rascher Abfall zu den Ausgangswerten erst nach 2 min einsetzte. Die Hemmung der Glykolyse blieb jedoch 3-4 min bestehen, bevor die Ausschüttung von Lactat plus Pyruvat wieder langsam anstieg; die Ausgangswerte wurden auch 20 min nach Absetzen der Glucagoninfusion nicht wieder erreicht.

3.2.2 Dosis-Wirkungsbeziehung des Glucagoneffekts auf Glykogenolyse und Glykolyse

Perfusionsexperimente - analog zu dem in Abb. 3 dargestellten - wurden mit Glucagon im Konzentrationsbereich von 0,01 nM - 100 nM durchgeführt (4 - 5 Experimente pro Glucagonkonzentration). Die Änderungen der metabolischen Geschwindigkeiten zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Glucagoninfusion von gleicher Konzentration wurden gemittelt und sind in Abb. 4 (Glykogenolyse) und Abb. 5 (Glykolyse) dargestellt. Abb. 4 zeigt, daß die Anfangsbeschleunigung und das erreichte Maximum der Glykogenolysesteigerung mit steigender Glucagonkonzentration zunehmen, die Latenzzeit bis zum Einsetzen der Hormonwirkung hingegen abnimmt. Der Abfall der Glykogenolyse nach Absetzen der Hormoninfusion beginnt umso später je höher die Glucagonkonzentration ist. Für die Glykolyse (Abb. 5) ist ebenfalls eine Konzentra-

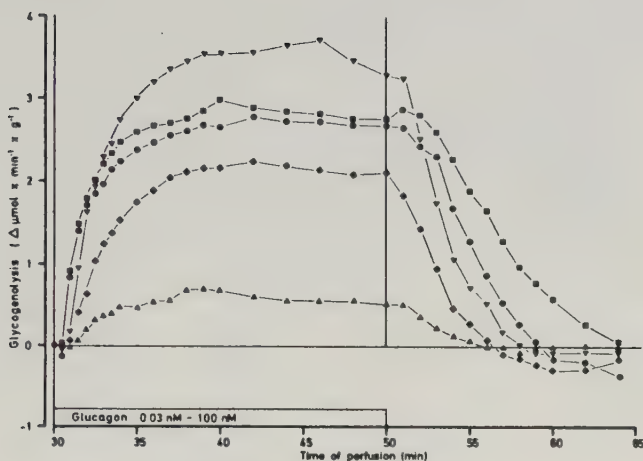


Abb. 4. Abhängigkeit der Glucagon-induzierten Glykogenolysestimulation von der Glucagonkonzentration in Lebern gefütterter Ratten

Experimente - analog Abb. 3 - wurden mit verschiedenen Glucagonkonzentrationen durchgeführt. Der Anstieg der Glykogenolysegeschwindigkeit bzw. deren Abfall nach Absetzen des Hormons wurde als Differenz zu der Geschwindigkeit vor Glucagoninfusion ausgedrückt. Die Werte aus jeweils 4 - 5 Experimenten jeder Konzentration (100 nM, ■ ; 10 nM, ● ; 0,3 nM, ▼ ; 0,1 nM, ◆ ; 0,03 nM, ▲) wurden gemittelt und gegen die Zeit aufgetragen. (Der Kurvenverlauf für 1 nM Glucagon ist nahezu identisch mit demjenigen für 10 nM und wurde zu Gunsten einer übersichtlicheren Darstellung weggelassen).

tionsabhängigkeit der Hemmung sowie der Latenzzeit bis zum Einsetzen der Hormonwirkung zu beobachten. Für beide Prozesse wurde eine Dosis-Wirkungskurve für die Änderung der metabolischen Geschwindigkeiten nach 20 min Glucagoninfusion erstellt (Abb. 6). Die Stimulation der Glykogenolyse war bereits bei einer Konzentration von 0,06 nM halbmaximal, wohingegen eine halbmaximale Hemmung der Glykolyse erst bei einer Konzentration von 0,2 nM erfolgte. Angenähert maximale Effekte wurden mit 0,3 nM bei der Stimula-

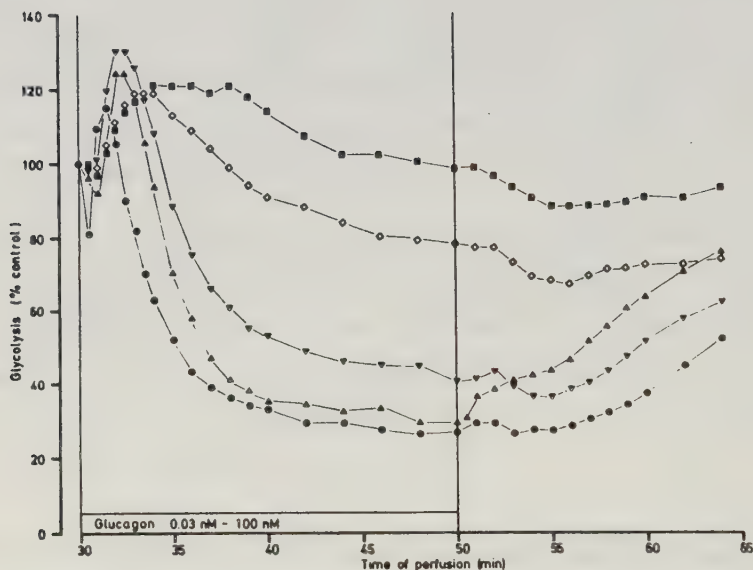


Abb. 5. Abhängigkeit der Glucagon-induzierten Glykolysehemmung von der Glucagonkonzentration in Lebern gefütterter Ratten

Die Konzentrationsabhängigkeit der Glykolysehemmung nach Glucagon sowie deren Reversibilität wurde aus den Versuchen ermittelt, die in Abb. 4 dargestellt sind. Die Glykolyse rate ist relativ zu der vor Glucagoninfusion bestehenden Geschwindigkeit angegeben (Ausgangswert = 100%). Die Mittelwerte von je 4-5 Experimenten jeder Konzentration (100 nM, ●; 1 nM, ▲; 0,3 nM, ▼; 0,1 nM, ◇; 0,03 nM, ■) sind gegen die Zeit aufgetragen.

tion der Glykogenolyse und mit 1 nM bei der Hemmung der Glykolyse erreicht. Die hormonabhängigen Regulationsmechanismen der Glykogenolyse scheinen demnach empfindlicher auf Glucagon anzusprechen als die der Glykolyse.

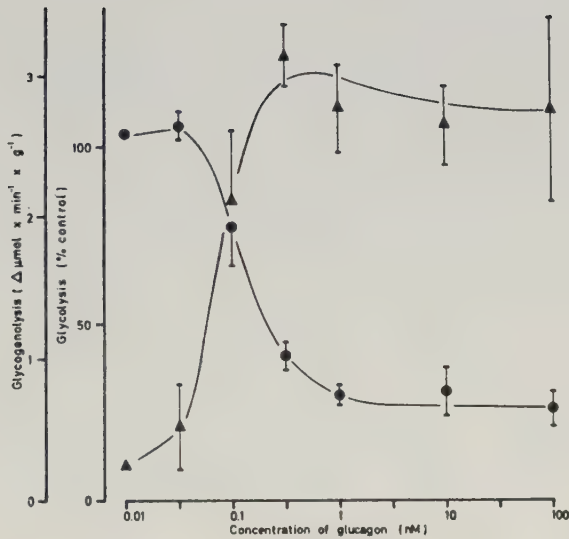


Abb. 6. Dosis-Wirkungsbeziehung des Glucagoneffekts auf Glykogenolyse ($\blacktriangle$) und Glykolyse ($\bullet$) in substratfrei perfundierten Lebern gefütterter Ratten

Experimente - analog Abb. 3 - wurden über einen Konzentrationsbereich von 0,01 nM - 100 nM Glucagon durchgeführt. Die Glykogenolysesteigerung wurde als Differenz der Ausgangswerte vor und der 20 min nach Beginn der Glucagoninfusion erreichten Geschwindigkeit ausgedrückt; die nach 20 min erreichten Glykolyseraten wurden relativ zu der vor Hormoninfusion bestehenden Geschwindigkeit angegeben. Einzelwerte (0,01 nM) bzw. die Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus jeweils 4-5 Experimenten wurden gegen die Glucagonkonzentration aufgetragen.

3.2.3 Glucagon-bedingte Veränderungen in Glykogenolyse und Glykolyse in hoher zeitlicher Auflösung

Die bisherigen Versuche (Abb. 3 und Abb. 5) zeigten, daß die Änderungen der Glykolysegeschwindigkeit unmittelbar nach Glucagongabe sehr komplex sind. Bevor die Hemmung der Glykolyse einsetzte, kam es zu einer dosisabhängigen vorübergehenden Stimulation der Lactat- plus Pyruvatproduktion. Die genaue zeitliche Aufeinanderfolge der Vorgänge wurde in Experimenten untersucht, in denen das Perfusat in 2 s oder 4 s Fraktionen gesammelt und analysiert wurde. Ein solcher Versuch ist in Abb. 7 beschrieben (Glucagonkonzentration 1 nM). Der erste sichtbare Effekt ist eine nach 60 s einsetzende Hemmung der Glykolyse von etwa 20%. Nach ca. 80 s steigt die Glykolysegeschwindigkeit wieder an; sie überschreitet den Ausgangswert und erreicht nach ca. 120 s ein vorübergehendes Maximum, das dann in die endgültige Hemmung der Glykolyse übergeht. Die Stimulation der Glykogenolyse setzt erst nach dem initialen Abfall, aber vor dem erneuten Anstieg der Glykolyse ein.

In Abb. 8 sind die Glykogenolysekinetiken von 5 Experimenten mit verschiedenen Glucagonkonzentrationen (0,1 nM - 100 nM) dargestellt. Die Latenzzeiten bis zum Ansprechen der Glykogenolyse (t_0) sind abhängig von der Glucagonkonzentration und betragen zwischen 20 s (100 nM) und 120 s (0,1 nM). Die Transitzeit des Glucagons von der Infusionsstelle vor der Leber bis zur Sammelstelle der Perfusatsproben beträgt etwa 3 s [12]; die tatsächlichen Latenzzeiten sind deshalb nur geringfügig kürzer.

Die initiale Glykolysehemmung war abhängig von der Glucagonkonzentration (Abb. 9; die Glykogenolysekinetiken aus den gleichen Experimenten sind in Abb. 8 dargestellt); die Latenzzeiten bis zum Einsetzen der Hormonwirkung

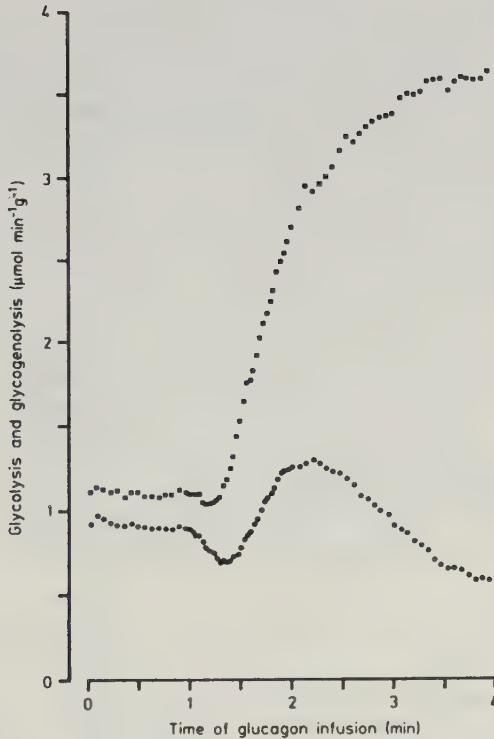


Abb. 7. Hohe zeitliche Auflösung der Glucagon-induzierten initialen Kinetik von Glykogenolyse (■) und Glykolyse (●)

Die Leber einer gefütterten Ratte wurde wie in Abb. 3 beschrieben perfundiert. Das venöse Perfusat wurde durch einen drehbaren Fraktionssammler in 2 s und 4 s Abständen aufgefangen. (Berechnung der Geschwindigkeiten von Glykogenolyse und Glykolyse siehe Abb. 3). Die ersten 4 min nach Beginn der Glucagoninfusion sind dargestellt.

variieren hier von etwa 10 s (100 nM) bis 60 s (0,3 nM). Der bei 100 nM deutlich ausgeprägte Effekt ist bei 0,1 nM nicht mehr feststellbar. Unabhängig von der Glucagonkonzentration tritt die initiale Hemmung der Glyko-

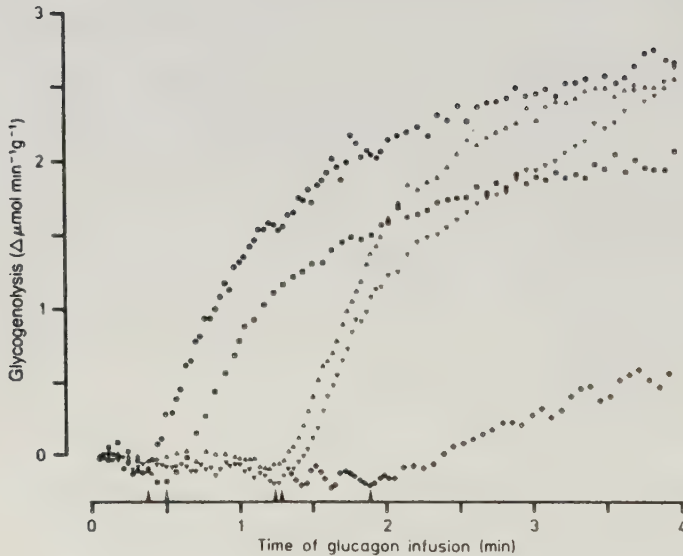


Abb. 8. Abhängigkeit des Einsetzens der Glykogenolysestimulation von der Glucagonkonzentration

Die Glykogenolysekinetiken von 5 Experimenten, die analog zu dem in Abb. 7 gezeigten Versuch durchgeführt wurden, sind dargestellt; die Glucagonkonzentrationen betrugen 100 nM (●), 10 nM (■), 1 nM (▲), 0,5 nM (▼) und 0,1 nM (◆). Die Geschwindigkeit der Glykogenolyse wurde wie in Abb. 4 angegeben berechnet. Die Pfeile bezeichnen das Einsetzen der Glykogenolysestimulation; sie wurden auf die entsprechenden Änderungen des Glykolyseflusses übertragen (vgl. Abb. 9).

lyse stets etwa 15 s - 20 s vor dem Beginn der Glykogenolysestimulation auf (vgl. die Lage der Pfeile in Abb. 8 und Abb. 9); man muß daher annehmen, daß der zur Hemmung der Glykolyse führende Reaktionsmechanismus schneller ist, als derjenige, der die Stimulation der Glykogenolyse bewirkt. Jeweils etwa 5 s - 10 s nach Einsetzen der Glykogenolysestimulation beginnt auch die Glykolysegeschwindigkeit wieder anzusteigen. Diese vo-

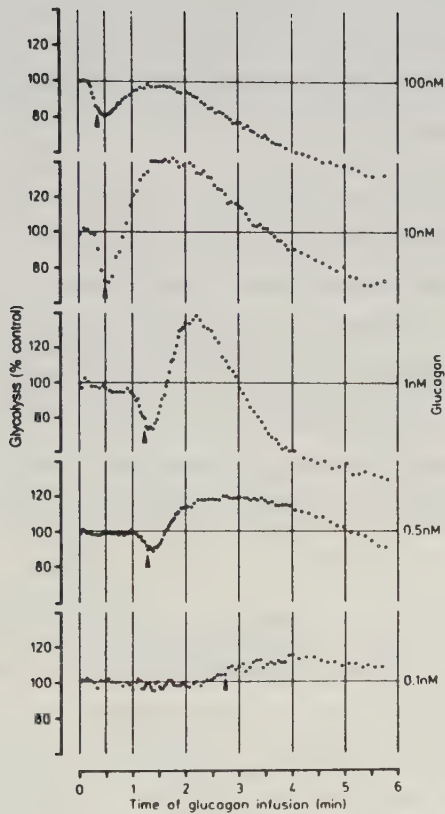


Abb. 9. Die initiale Glykolysekinetik in Abhängigkeit von der Glucagonkonzentration

Die zu den Glykogenolyseänderungen (Abb. 8) korrespondierenden Glykolysekinetiken wurden dargestellt (100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,5 nM und 0,1 nM, von oben nach unten). Die Lactat- plus Pyruvatausschüttung wurde relativ zu der Glykolysegeschwindigkeit vor Beginn der Hormoninfusion angegeben (Ausgangswert = 100%). Die Pfeile bezeichnen den Zeitpunkt des Einsetzens der Glykogenolysestimulation nach Beginn der Glucagoninfusion (vgl. Abb. 8).

rübergehende Stimulation der Glykolyse war maximal bei 1 - 10 nM, aber deutlich submaximal bei 100 nM. Offensichtlich besteht der Glucagon-effekt auf die Glykolyse aus mindestens 2 Komponenten - einer hemmenden und einer stimulierenden, die sich durch unterschiedliche Dosisabhängigkeiten und Zeitverläufe auszeichnen.

Die zeitliche Koinzidenz des Anstiegs in Glykogenolyse und Glykolyse legt nahe, daß es sich bei der Stimulation der Glykolyse um eine direkte Folge der gesteigerten Glykogenolyse handelt; möglicherweise vermag ein erhöhter Anfall von Hexose-6-Phosphaten - trotz der gleichzeitig ablaufenden Glucagon-bedingten Hemmung der Glykolyse - zu einer vorübergehenden Stimulation der Glykolyse führen. Wenn diese Annahme richtig ist, müßte die vorübergehende Stimulation der Glykolyse in Lebern ausbleiben, in denen nur wenig oder keine Glykogenolyse stattfinden kann, z.B. in Lebern gehungerter Tiere.

Tatsächlich war der Glykolyse-stimulierende Effekt des Glucagons in Lebern gehungerter Ratten, die mit Medium verschiedenener Glucosekonzentrationen perfundiert wurden, sehr viel geringer ausgeprägt, wenn auch nicht ganz verschwunden (Abb. 10); dies kann möglicherweise auf eine geringe Glykogensynthese in der Glucose-Vorperfusionsperiode zurückgeführt werden. Auch bei Lebern gefütterter Ratten, die mit Glucose-haltigem Medium perfundiert wurden, war die transitorische Glykolysestimulation geringer ausgeprägt. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der beobachteten Glykogenolysehemmung durch Glucose, die durch Glucagon nur teilweise durchbrochen werden kann (siehe unten, Kap. 3.2.5).

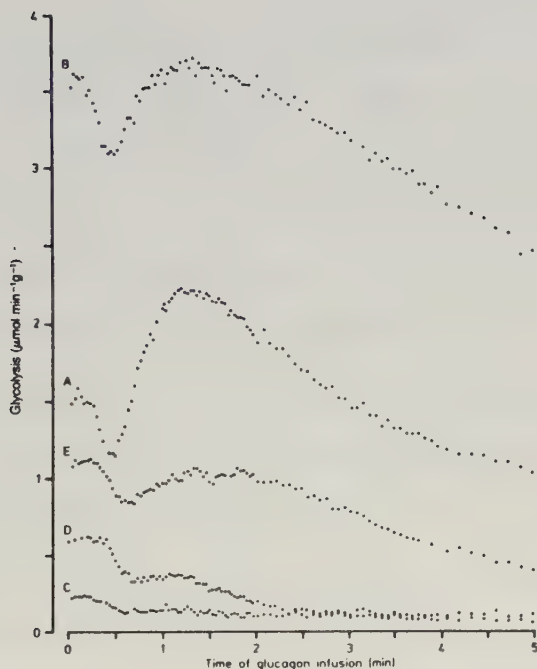


Abb. 10. Initiale glykolytische Flußänderungen nach Glucagon in Lebern gefütterter und gehungerter Ratten in An- und Abwesenheit von exogener Glucose

Die Glykolyseraten nach Infusion von Glucagon (10 nM) wurden in 2 Perfusionsexperimenten bestimmt. (A,B) Im ersten Versuch wurde die Leber einer gefütterten Ratte 40 min substratfrei vorperfundiert bevor für 6 min Glucagon infundiert wurde (A); nach weiteren 40 min Perfusion mit 35 mM Glucose wurde das Hormon ein zweites Mal gegeben (B). (C-E) Die Leber einer gehungerten Ratte wurde mit schrittweise ansteigenden Glucosekonzentrationen (10 mM, C; 20 mM, D; 35 mM, E) für jeweils 30 min perfundiert. Glucagon wurde am Ende jeder Periode infundiert. Jeweils die ersten 5 min nach Beginn der Glucagoninfusion sind dargestellt. Die Berechnung der Glykolysegeschwindigkeit erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben.

3.2.4 Analyse der Kinetik der durch Glucagon bewirkten Steigerung der Glykogenolyse

Im Gegensatz zu den Änderungen der Glykolysegeschwindigkeit scheint die Stimulation der Glykogenolyse durch Glucagon ein einheitlicher Prozess zu sein. Die Relaxationskinetiken der Geschwindigkeitsänderungen der Glykogenolyse widersprechen aber dieser Annahme. Die Relaxationskinetiken wurden ermittelt, indem die Differenzen der erreichten Maximalgeschwindigkeit der Glykogenolyse ($v(\max)$) und der zu den jeweiligen Zeitpunkten gemessenen Geschwindigkeit ($v(t)$) gebildet und logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen wurden. In Abb. 11 sind die Meßdaten eines Versuchs mit einer Glucagonkonzentration von 100 nM stellvertretend für die anderen Konzentrationen dargestellt. Hieraus geht hervor, daß der Glucagoneffekt auf die Glykogenolyse sich aus zwei exponentiellen Kinetiken zusammensetzt, deren Halbwertszeiten ca. 16 s bzw. 84 s betragen. In Tab. 4 sind die auf diese Weise ermittelten Halbwertszeiten für die verschiedenen Glucagonkonzentrationen dargestellt. Danach muß man annehmen, daß die Relaxationszeiten der beiden Komponenten unabhängig von der Glucagonkonzentration sind. Der nach Beendigung des Hormons einsetzende Abfall der Glykogenolysegeschwindigkeit weist Halbwertszeiten auf, die denen der langsamen Komponente der Glykogenolysestimulation entsprechen. Bei hohen Konzentrationen sind sie jedoch wesentlich länger und betragen bis zu 200 s. Diese Verlängerung der Halbwertszeiten hängt wahrscheinlich mit einer verzögerten Auswaschung des Glucagons von den Rezeptoren bei hohen Glucagonkonzentrationen zusammen, die auch durch die verlängerten Latenzzeiten nach Beendigung der Glucagoninfusion bis zum Beginn des Glykogenolyseabfalls (< 1 min bei 0,1 nM; 2-3 min bei 100 nM) zum Ausdruck kommt.

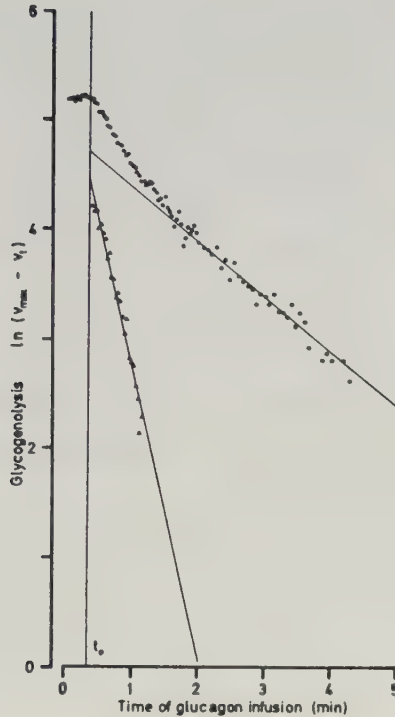


Abb. 11. Analyse der Glykogenolysekinetik durch "exponential peeling"

Das dargestellte Experiment wurde analog zu dem in Abb. 7 gezeigten Versuch durchgeführt. Zur Analyse der Kinetik der Glykogenolysestimulation wurden die Differenzen der jeweiligen Glykogenolysegeschwindigkeiten ($\mu\text{mol/min} \times \text{g}$; $v(t)$) und der erreichten Maximalgeschwindigkeit ($v(\text{max})$) gebildet und logarithmisch ($\ln$) gegen die Zeit aufgetragen (●). Die graphische Darstellung zeigt einen Kurvenverlauf, der in zwei Komponenten zerlegbar ist; jede dieser Komponenten kann durch eine Gerade beschrieben werden. Zur Ermittlung der Halbwertszeiten wurde zunächst die Steigung der die langsamere Kinetik beschreibenden Geraden ermittelt und $t_{1/2}$ über die Gleichung $t_{1/2} = -1/m \times \ln 2$ errechnet. Zur Ermittlung der Halbwertszeit der schnelleren Kinetik wurde die korrespondierenden Werte der langsameren errechnet und von den jeweiligen Meßwerten subtrahiert (▲); hierdurch wurde eine Darstellung der schnellen Kinetik erreicht ("exponential peeling"). Ihre Halbwertszeit wurde analog errechnet. Bei dieser Form der Darstellung betragen die Steigungen der Geraden $m = -0,044/\text{s}$ für die schnelle und $m = -0,008/\text{s}$ für die langsame Kinetik, entsprechend Halbwertszeiten von 16 s bzw. 87 s.

Tabelle 4

Glucagon	0.1 nM	0.3 nM	1 nM	10 nM	100 nM
On					
t 1/2 ₁	- (1)	22s [*] (1)	14s (1)	16s (1)	16s (1)
t 1/2 ₂	109s ± 21s (3)	99s ± 15s (4)	95s ± 8s (5)	125s ± 6s (5)	100s ± 10s (5)
Off					
t 1/2	186s (1)	116s (1)	87s ± 3s (3)	136s ± 8s (4)	203s ± 11s (3)

* 0.5 nM Glucagon

Tabelle 4. Halbwertszeiten der Glykogenolysekinetiken nach Beginn sowie nach Beendigung der Glucagoninfusion

Die Glykogenolysekinetiken von Versuchen analog der in Abb. 3 und 7 dargestellten Experimente wurden wie in Abb. 11 beschrieben für die Phase nach Beginn sowie nach Beendigung der Glucagoninfusion (0,01 nM – 100 nM) analysiert. Für die Phase nach Einsetzen der Glucagonwirkung wurden (außer bei 0,1 nM) regelmäßig 2 Kinetiken beobachtet, eine schnelle (t 1/2(1)) und eine langsamere (t 1/2(2)); oben. Für die nach Absetzen des Hormons wurde jedoch bei allen Konzentrationen nur eine Komponente nachgewiesen; unten. Die jeweils zur Errechnung der Werte verwendete Versuchszahl ist in Klammern angegeben.

3.2.5 Hemmung der Glykogenolyse durch Glucose und Aufhebung der Hemmung durch Glucagon

Eine Hemmung der Glucosemobilisation aus Glykogen durch Glucose in der isolierten, mit erythrozytenhaltigem Medium rezirkulierend perfundierten Rattenleber ist seit langem bekannt [56]. Es wurde gezeigt, daß Glucose unter diesen Bedingungen zu einer Hemmung der Glykogenphosphorylase und einer Stimulation der Glykogensynthetase führt [21, 57]; dieselbe Wirkung wurde auch in isolierten Hepatozyten nachgewiesen [70]. Der primäre Effekt der Glucosewirkung ist dabei eine Bindung an die aktive Glykogenphospho-

rylase a [161], wodurch deren Dephosphorylierung zur inaktiven Phosphorylase b durch die Phosphorylase-Phosphatase begünstigt wird [160]. Da die Phosphorylase a ein starker Inhibitor der Glykogensynthetase-Phosphatase ist, führt ihr Verschwinden in der Folge zu einer Aktivierung der Glykogensynthetase [159]). GLINSMANN et al. wiesen darauf hin, daß Glucagon diesen Glucoseeffekt unter ihren Versuchsbedingungen verhindern kann [57].

Am Modell der isolierten, nicht-rezirkulierend perfundierten Rattenleber lassen sich die Auswirkungen dieses Antagonismus auf die Geschwindigkeit des Netto-Glykogenolyseflusses untersuchen, indem man den Glucosepool durch Infusion von $[U-^{14}C]$ Glucose radioaktiv markiert. In dem in Tab. 2 beschriebenen Experiment wurden der Leber einer gefütterten Ratte unterschiedliche Konzentrationen $[U-^{14}C]$ -markierter Glucose (2 mM - 35 mM) infundiert. Die Verdünnung exogen zugeführter radioaktiv markierter Glucose durch endogen aus Glykogen gewonnene Glucose läßt sich mit Hilfe der relativen spezifischen Radioaktivität des Lactats (bezogen auf die spezifische Radioaktivität der zugeführten Glucose = 1,0) bestimmen: Im Glucoseabbau entstehen in der Aldolasereaktion 2 Triosen aus einer Hexose; daher muß die Radioaktivität in einem aus $[U-^{14}C]$ Glucose entstandenen Lactatmolekül die Hälfte der Radioaktivität der zugeführten Glucose betragen. Bei ausschließlichem Abbau von exogen zugeführter markierter Glucose (ohne jede Verdünnung durch endogenes Substrat) müßte die relative spezifische Aktivität des Lactats 0,5 betragen; jeder Wert unter 0,5 weist auf eine intrazelluläre Verdünnung - vorwiegend auf der Ebene des Glucose-6-Phosphats aufgrund des Glykogenabbaus - hin. Im oben erwähnten Experiment betrug die relative spezifische Aktivität des Lactats bei Infusion von 2 mM Glucose 0,03, was eine 10-20fache Verdünnung des Lactatpools durch endogenes Sub-

strat bedeutet. Mit zunehmender exogener Glucosezufuhr steigt die Aktivität auf 0,49 bei 35 mM Glucose an; unter diesen Bedingungen wird also fast ausschließlich exogene Glucose abgebaut, die Glykogenolyse ist unter diesen Bedingungen fast vollständig supprimiert. Die Infusion von 10 nM Glucagon konnte jedoch in Anwesenheit von 35 mM Glucose die relative spezifische Aktivität des Lactats auf 0,29 senken.

Glucose führt demnach auch unter diesen Bedingungen bei einer Konzentration von 35 mM zu einer vollständigen Hemmung der Glykogenolyse. Glucagon kann diesen Effekt - wahrscheinlich durch einen Cyclo-AMP-abhängigen Mechanismus - gegenregulieren. Eine vollständige Reversibilität der Glucose-induzierten Hemmung der Glykogenolyse war jedoch 20 min nach Beginn der Glucoseinfusion nicht zu beobachten. Eine physiologische Bedeutung dieses Effekts - im Zusammenhang mit der Glucagon-bedingten Hemmung der Glykolyse könnte sein, daß in einer akuten Stresssituation, in der sowohl die Glucose- als auch die Glucagonkonzentration [11, 95, 178] erhöht sind, die dringend in der Peripherie benötigte Glucose nicht von der Leber extrahiert wird, wie es normalerweise bei hohen Glucosekonzentrationen der Fall ist.

3.3 Glucagonwirkung auf den Sauerstoffverbrauch

3.3.1 Glucagoneffekt auf den Sauerstoffverbrauch der substratfrei perfundierten Leber einer gefütterten Ratte

Ein wichtiges Kriterium zur Qualitätskontrolle einer Leberpräparation ist der Sauerstoffverbrauch, der routinemäßig mitgemessen wurde. In den vorausgehend beschriebenen Experimenten zur Wirkung des Glucagons auf Glykogenolyse und Glykolyse wurde regelmäßig beobachtet, daß nach Beginn der Glucagoninfusion der Sauerstoffverbrauch mit charakteristischer Kinetik anstieg und nach Absetzen der Hormoninfusion wieder abfiel. Ein repräsentatives Perfusionsexperiment wird in Abb. 12 gezeigt, in der neben dem Zeitverlauf der Änderungen in Glykogenolyse und Glykolyse auch die Änderungen im Sauerstoffverbrauch unter dem Einfluß einer zweimaligen Glucagoninfusion gezeigt werden. Es handelte sich bei diesem Experiment um die Leber einer gefütterten Ratte, die mit substratfreiem Krebs-Henseleit Bicarbonatpuffer perfundiert wurde; Glykogen war somit das ausschließliche Substrat für die Bildung von Lactat, Pyruvat und Glucose. Die Sauerstoffkonzentration im ausfließenden Perfusat wurde mittels einer Platinelektrode kontinuierlich registriert. Da die arteriellen Sauerstoffkonzentrationen und der Perfusatfluß konstant waren, lassen sich die Änderungen der venösen Konzentration als Änderungen in der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs angeben. Die Perfusatproben für die enzymatische Metabolitanalyse wurden unmittelbar hinter der Platinelektrode entnommen. Die Verzögerung der Metabolitanalysen gegenüber der Sauerstoffmessung betrug weniger als 5 s und wird durch die Zeitkonstante der Platinelektrode in ungefähr gleicher Größe ausgeglichen. Unterschiede in der Gleichzeitigkeit von Sauerstoffregistrierung und Messung der Metabolite spielen daher bei

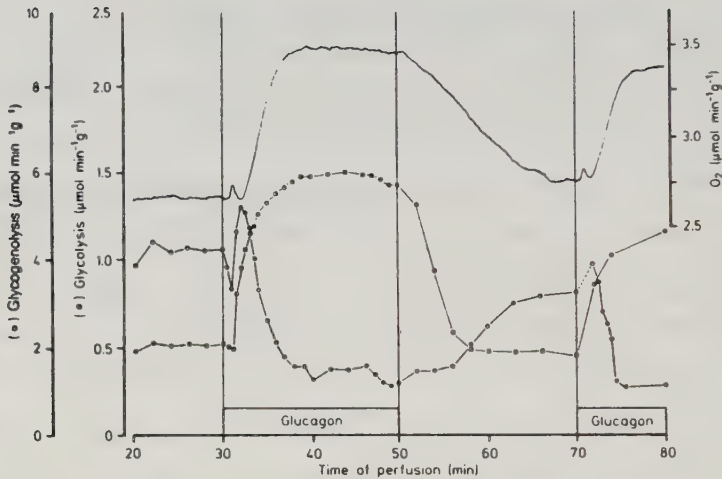


Abb. 12. Glucagonwirkung auf Glykogenolyse, Glykolyse und Sauerstoffverbrauch in der substratfrei perfundierten Leber einer gefütterten Ratte

Die Leber einer gefütterten Ratte wurde perfundiert wie in Abb. 3 beschrieben. Glucagon (1 nM) wurde von min 30 - 50 sowie von min 70 - 80 infundiert. Die Proben wurden in 0,5, 1 und 2 min Abständen gewonnen und enzymatisch auf Glucose, Lactat und Pyruvat analysiert. Die Sauerstoffkonzentration im venösen Perfusat wurde mit einer Platinelektrode kontinuierlich aufgezeichnet. Glykogenolyse (Glucose + 1/2 Lactat + 1/2 Pyruvat; ■) und Glykolyse (1/2 Lactat + 1/2 Pyruvat; ●) wurden zum Vergleich mit dem Sauerstoffverbrauch (O_2 , $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$; —) dargestellt.

der relativ geringen Auflösung der Kinetiken keine Rolle (Meßwerte im 30 s Abstand).

Nach Beginn der Glucagoninfusion (1 nM) wurden für die Dauer von 2 min - außer einem minimalen, vorübergehenden Anstieg, der reproduzierbar war - keine Änderungen im Sauerstoffverbrauch beobachtet. In dieser Phase kam es dagegen bereits zu erheblichen Änderungen in Glykogenolyse und Glykolyse. Erst nach 2 min begann der Sauerstoffverbrauch anzusteigen und erreichte

nach 10 min ein Maximum. Der Anstieg betrug ungefähr $0,8 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$, d.h. 30% des basalen Sauerstoffverbrauchs. Es fiel auf, daß das Einsetzen des Anstiegs im Sauerstoffverbrauch zeitlich eng zusammenfällt mit dem Beginn des endgültigen Abfalls der Glykolysegeschwindigkeit und daß beide Effekte eine sehr ähnliche Kinetik haben. Auch scheint eine quantitative Beziehung zwischen den beiden Parametern zu bestehen: ein Anstieg von $0,8 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ stand einem Abfall von $1,5 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ Lactat plus Pyruvat gegenüber. Eine Gleichartigkeit im Zeitverlauf und Betrag war auch nach Absetzen der Glucagoninfusion zu erkennen. Im Unterschied zur Glykolyse scheint aufgrund der Zeitverläufe keine Beziehung zwischen Sauerstoffverbrauch und Glykogenolyse zu bestehen. Die Effekte waren bei erneuter Glucagoninfusion reproduzierbar.

Die beobachteten Änderungen im Sauerstoffverbrauch nach Glucagoninfusion, die in Abb. 12 in einem Einzelexperiment mit 1 nM Glucagon beschrieben worden sind, ließen sich in einer größeren Serie von Experimenten mit Konzentrationen zwischen 0,1 nM - 100 nM Glucagon bestätigen. Die Änderungen im Sauerstoffverbrauch werden in Abb. 13 gezeigt. Mit einer Konzentration von 10 nM Glucagon wurde ein maximaler Effekt beobachtet; selbst mit 0,1 nM Glucagon betrug die Steigerung im Sauerstoffverbrauch noch 30% des Maximalwerts. Die Latenzzeiten bis zum Einsetzen der Glucagonwirkung war bei höheren Glucagonkonzentrationen verkürzt (ca. 3,5 min bei 0,1 nM, jedoch kleiner als 0,5 min bei 100 nM). Mit Erhöhung der Glucagonkonzentration verkürzten sich auch die Halbwertszeiten der Kinetiken (ca. 4 min bei 0,1 nM, jedoch nur ca. 2 min bei 100 nM). Die Änderungen im Sauerstoffverbrauch waren nach Absetzen der Glucagoninfusion reversibel; die Rückbildung verlief jedoch wesentlich langsamer als der Anstieg nach Einsetzen

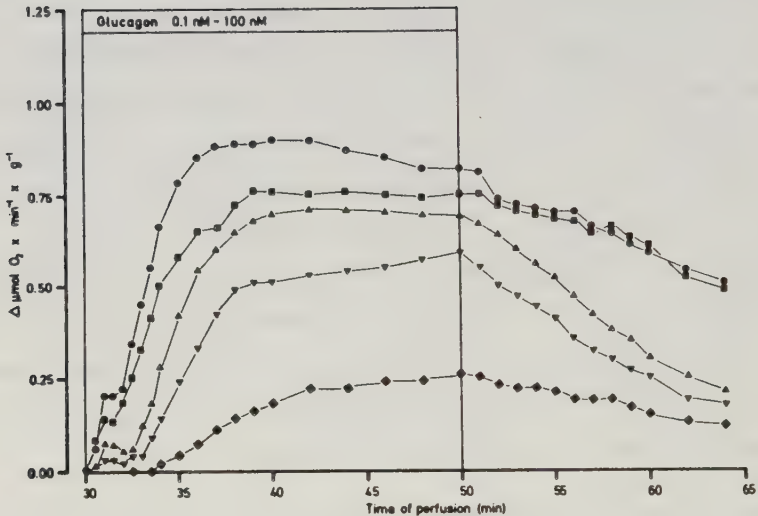


Abb. 13. Abhängigkeit des Glucagon-induzierten Anstiegs im Sauerstoffverbrauch von der Glucagonkonzentration in Lebern gefütterter Ratten

Versuche - analog Abb. 12 - wurden mit unterschiedlichen Glucagonkonzentrationen durchgeführt. Der Anstieg im Sauerstoffverbrauch (O_2) wurde als Differenz zum Ausgangswert vor Glucagoninfusion dargestellt. Die so erhaltenen Werte von jeweils 4 - 5 Experimenten jeder Konzentration (100 nM, ■; 10 nM, ●; 1 nM, ▲; 0,3 nM, ▼; 0,1 nM, ◆) wurden gemittelt und gegen die Zeit aufgetragen.

der Hormoninfusion. Die schnellste Rückbildung wurde im mittleren Konzentrationsbereich (0,3 nM, 1 nM) beobachtet, wohingegen bei hohen Konzentrationen eine stark verzögerte Rückbildung registriert wurde. Für dieses Phänomen ist vermutlich die noch über einige Minuten persistierende Glucagonwirkung durch den verlängerten Zeitbedarf zur vollständigen Auswaschung hoher Glucagonkonzentrationen verantwortlich.

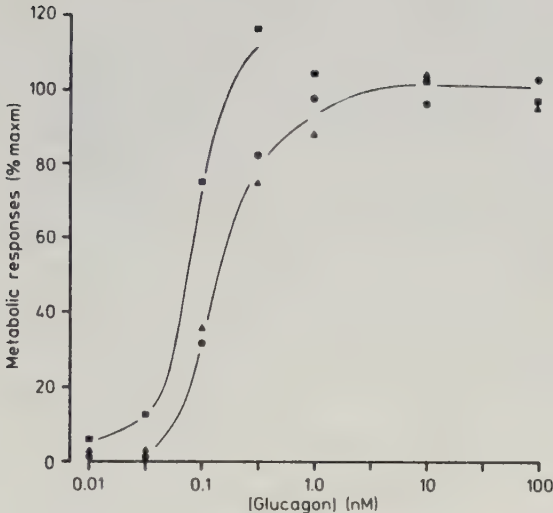


Abb. 14. Vergleichende Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Sauerstoffverbrauch, Glykolyse und Glykogenolyse nach Glucagon in perfundierten Lebern gefütterter Ratten

Die Geschwindigkeit des Sauerstoffanstiegs (▲), der Glykolyse (●) und der Glykogenolyse (■) wurden Experimenten analog zu dem in Abb. 12 gezeigten entnommen. Die Dosis-Wirkungsbeziehung des Sauerstoffverbrauchs nach Glucagon (0,01 nM – 100 nM; $n = 4 - 5$) wurde mit der von Glykogenolyse und Glykolyse (Abb. 6) verglichen. Hierzu wurden die 20 min nach Beginn der Glucagoninfusion erreichten Geschwindigkeiten als Prozentsatz des maximalen Anstiegs (Sauerstoffverbrauch und Glykogenolyse) oder der maximalen relativen Hemmung (Glykolyse) ausgedrückt (100% entsprechen dem Mittelwert der jeweils mit 10 nM und 100 nM erreichten Geschwindigkeit).

3.3.2 Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen den Änderungen in der Geschwindigkeit von Glykogenolyse, Glykolyse sowie des Sauerstoffverbrauchs und der Glucagonkonzentration

Ein Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehungen der prozentualen Änderungen in Glykogenolyse, Glykolyse und Sauerstoffverbrauch (bezogen auf den jeweiligen Maximaleffekt, Abb. 14) zeigt für Glykolyse und Sauerstoffverbrauch

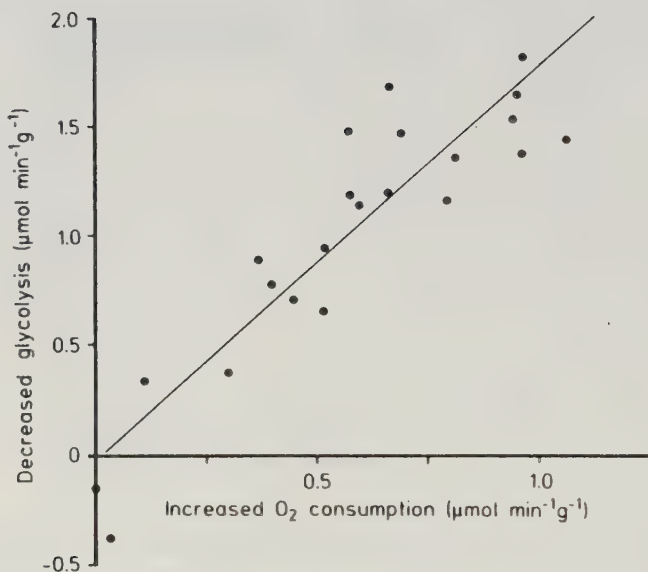


Abb. 15. Korrelation des Glykolyseabfalls und des Sauerstoffanstiegs nach Glucagon

Die Daten stammen von den Versuchen, die in Abb. 14 zur Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung verwendet wurden (Glucagonkonzentrationen 0,01 nM - 100 nM). Der Betrag des Geschwindigkeitsabfalls der Glykolyse (Produktion von Lactat plus Pyruvat) wurde gegen den korrespondierenden Sauerstoffanstieg (jeweils 10 min nach Beginn der Glucagoninfusion) aufgetragen. Die Regressionsgerade, die aus 22 Datenpaaren errechnet wurde, ergab die Gleichung $f(x) = 1,8x - 0,03$, mit einem linearen Korrelationsfaktor $r = 0,90$.

eine ähnliche Abhängigkeit von der Glucagonkonzentration. Halbmaximale Effekte wurden in beiden Parametern bei 0,2 nM beobachtet. Dagegen scheint die Glykogenolyse empfindlicher auf Glucagon anzusprechen. Die Stimulation des Glykogenabbaus war bereits bei 0,06 nM Glucagon halbmaximal.

Table 1. Relationship between decrease in glycolysis and increase in oxygen consumption due to glucagon in perfused rat liver. The data were derived from the series of experiments summarized in Fig. 2 (experimental protocol shown in Fig. 1). The relationship between decrease in rates of glycolysis (lactate plus pyruvate production) and increase in oxygen consumption was demonstrated two ways: first, calculation of the ratios of changes in metabolic rates due to the various glucagon concentrations 20 min following onset of infusion (mean rates $\pm$ SEM and ratios of the means; upper part); second, regression analysis of the individual pairs of data obtained with different glucagon concentrations at 5 min, 10 min and 20 min of glucagon action as demonstrated in Fig. 3 (slope and linear correlation coefficient, r ; lower part). From ratios and slopes the P ratios were calculated assuming that in glycolysis with glycogen as substrate, 1.5 mol ATP are generated/mol of lactate plus pyruvate produced (i.e. slope or ratio were multiplied by 1.5 and divided by 2)

Glucagon concn nM	Time min	n	Lactate(L) + pyruvate(P) production $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$	Oxygen consumption	$-\Delta(L+P)/\Delta O_2$ Slope	r	P/O
0.1	20	5	-0.48 ± 0.20	0.26 ± 0.07	1.85	—	1.38
0.3	20	4	-1.10 ± 0.23	0.59 ± 0.06	1.86	—	1.40
1.0	20	4	-1.40 ± 0.27	0.69 ± 0.11	2.03	—	1.52
10	20	4	-1.49 ± 0.08	0.82 ± 0.07	1.82	—	1.36
100	20	5	-1.52 ± 0.12	0.75 ± 0.07	2.03	—	1.52
0.1–100	5	22	—	—	—	1.75	1.31
0.1–100	10	22	—	—	—	1.77	0.90
0.1–100	20	22	—	—	—	1.83	1.37

Legende zu Tabelle 5.

Zusammenhang zwischen Glykolysehemmung und Anstieg im Sauerstoffverbrauch nach Glucagon in der perfundierten Rattenleber

Die Daten wurden den in Abb. 14 verwendeten Versuchen entnommen. Der Zusammenhang des Abfalls der Glykolysegeschwindigkeit (Lactat- plus Pyruvatproduktion) und des Anstiegs im Sauerstoffverbrauch nach Glucagoninfusion wurde auf zwei Arten untersucht: Zunächst wurde der Quotient aus den Änderungen in Glykolyse und Sauerstoffverbrauch 20 min nach Einsetzen der Glucagoninfusion für verschiedene Konzentrationen (0,1 nM - 100 nM) gebildet (Mittelwerte + S.E.M. und Quotienten der Mittelwerte; oben). Anschließend wurde eine Regressionsanalyse der einzelnen Datenpaare 5 min, 10 min und 20 min nach Beginn der Glucagonwirkung (vgl. Abb. 15) durchgeführt (Steigung der Regressionsgeraden und Korrelationskoeffizient r ; unten). Aus den ermittelten Quotienten bzw. Steigungen wurde der P/O-Quotient errechnet unter der Annahme, daß bei der Glykolyse aus Glykogen 1,5 Mol ATP/Mol produziertem (Lactat + Pyruvat) gebildet werden (die Steigung bzw. der Quotient wurden daher mit 1,5 multipliziert und anschließend durch 2 dividiert).

3.3.3 Korrelation zwischen Anstieg im Sauerstoffverbrauch und Abfall der Glykolysegeschwindigkeit nach Glucagon

Um einen möglichen Zusammenhang beider Prozesse wahrscheinlicher zu machen, wurde eine Korrelationsanalyse zwischen dem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und dem Abfall der Glykolyse durchgeführt. Hierzu wurden die jeweils nach 10-minütiger Glucagonperfusion (0,1 nM - 100 nM) erreichten Änderungen gegeneinander aufgetragen (Abb. 15). Die Analyse ergab eine lineare Korrelation der beiden Parameter mit einem Korrelationskoeffizient von 0,9. Diese Beziehung läßt sich durch die Funktionsgleichung $f(x) = 1,8x - 0,03$ ausdrücken. Die Steigung der Geraden besagt, daß einem Mehrverbrauch an Sauerstoff von 1 Mol eine Minderproduktion von 1,8 Mol Lactat plus Pyruvat entspricht. Diese Stöchiometrie wurde unabhängig von der Glucagonkonzentration (Tab. 5, oben) und dem Zeitpunkt nach Beginn der Glucagoninfusion (5, 10 und 20 min; Tab. 5, unten) gefunden.

3.3.4 Glucagoneffekt auf den Sauerstoffverbrauch in Lebern mit geringem glykolytischen Fluß

Wie gezeigt wurde haben die Hormon-induzierten Änderungen in der Glykolyse und im Sauerstoffverbrauch - im Gegensatz zu denen in der Glykogenolyse - eine sehr ähnliche Dosis-Wirkungsbeziehung sowie sehr ähnliche Zeitverläufe. Die Beträge der Änderungen zeigen bei verschiedenen Glucagonkonzentrationen sowie zu verschiedenen Zeitpunkten der Glucagonwirkung eine enge lineare Korrelation. Eine kausale Beziehung liegt deshalb nahe. Wenn diese Hypothese zutrifft, sollte der Glucagon-bedingte Anstieg des Sauerstoffverbrauchs unter Bedingungen mit geringer Glykolysegeschwindigkeit vermindert sein - entweder aus Substratmangel oder aufgrund einer bereits vor Glucagongabe vorliegenden Hemmung der Glykolyse.

Die Infusion von Glucagon (1 nM) löst in perfundierten Lebern gehungerter Ratten nur minimale Effekte bei den gemessenen Parametern aus (Abb. 16). Die vorher bereits sehr geringe Ausschüttung von Lactat plus Pyruvat, Glucose und Harnstoff wird nicht gesteigert; es kommt auch nicht zu einer Stimulation der Ketonkörperproduktion. Lediglich der Sauerstoffverbrauch wird geringfügig gesteigert; der Anstieg beträgt ungefähr 15% des Wertes, den man mit der gleichen Glucagonkonzentration in Lebern gefütterter Ratten findet.

Von Äthanol ist bekannt, daß seine Oxidation die hepatische Glykolyse hemmt [168]. In dem Experiment, das in Abb. 17 gezeigt wird, war die Glykolysegeschwindigkeit nach Gabe von Äthanol (2 mM) auf ein Drittel ihrer Ausgangsgeschwindigkeit verringert. In diesem Zustand führte die Glucagoninfusion (10 nM) nur zu einer geringen weiteren Hemmung der Lactat-

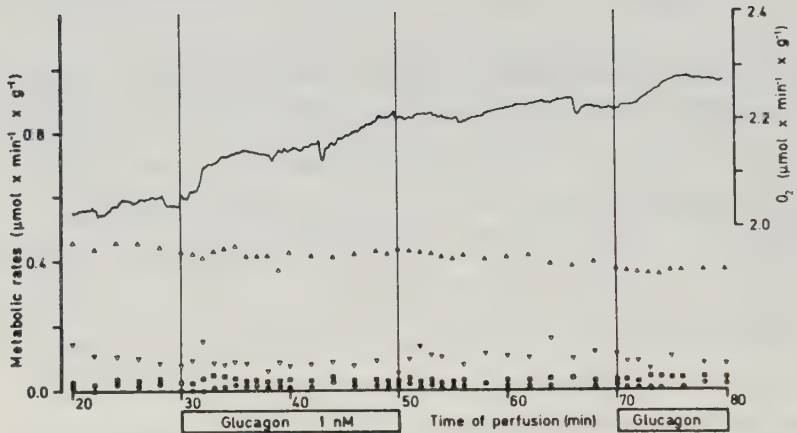


Abb. 16. Glucagonwirkung auf die Produktion von Glucose, Lactat plus Pyruvat, Ketonkörpern (3-Hydroxybutyrat plus Acetoacetat) und Harnstoff sowie auf den Sauerstoffverbrauch in der Leber einer gehungerten Ratte

Die Produktion von Glucose (■), Lactat plus Pyruvat (C6-Einheiten, ●) und Ketonkörpern (▲), die Harnstoffsynthese (▼) und der Sauerstoffverbrauch (—) in An- und Abwesenheit von Glucagon wurden in einer mit substratfreiem Krebs-Henseleit Bicarbonatpuffer perfundierten Leber einer 48 h gehungerten Ratte bestimmt; die Geschwindigkeit der metabolischen Prozesse wurde in $\mu\text{Mol}/\text{min} \times \text{g}$ angegeben. Glucagon (1 nM) wurde von min 30 – 50 sowie von min 70 – 80 infundiert.

plus Pyruvatproduktion. Der Anstieg im Sauerstoffverbrauch war ebenfalls minimal, während der Glucagoneffekt auf die Glykogenolyse voll ausgebildet war. Im weiteren Verlauf des Experiments wurde die Äthanolinfusion abgesetzt; die Glykolysegeschwindigkeit stieg wieder an. Eine erneute Glucagoninfusion führte jetzt zu einer deutlichen Hemmung der Glykolyse und – wie nach der Hypothese eines kausalen Zusammenhangs zu erwarten war – zu einem erheblichen Anstieg im Sauerstoffverbrauch.

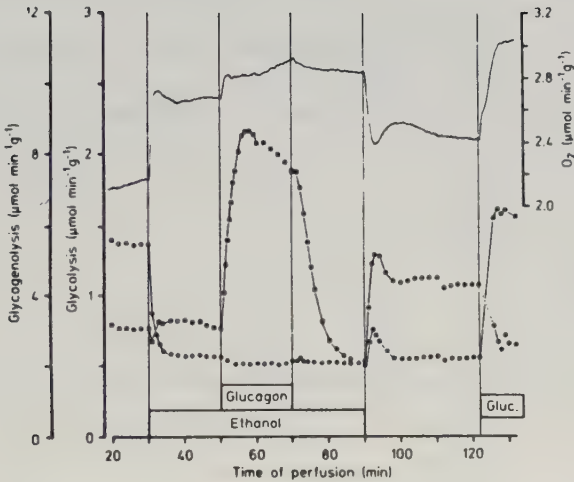


Abb. 17. Glucagonwirkung auf Glykogenolyse, Glykolyse und den Sauerstoffverbrauch in An- und Abwesenheit von Äthanol

Die Leber einer gefütterten Ratte wurde mit Krebs-Henseleit Bicarbonatpuffer perfundiert; Äthanol (2 mM) wurde von min 30 - 90 infundiert. Glucagon (10 nM) wurde zweimal gegeben, von min 30 - 50 sowie von min 122 - 132. Die Versuchsdurchführung und die Berechnung der Geschwindigkeiten von Glykogenolyse (■), Glykolyse (●) und Sauerstoffverbrauch (—) erfolgten analog Abb. 3 bzw. Abb. 12.

Nicht vollständig in Einklang mit der Hypothese steht allerdings die folgende Beobachtung. Durch Perfusion mit glucosehaltigem Medium (20 mM) kann die Leber einer gehungerten Ratte zu einer Glykolyse aus exogenem Substrat angeregt werden ($0,6 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$), die durch Glucagon (10 nM) rasch und vollständig gehemmt wird. Gleichzeitig kam es zu einem raschen Anstieg im Sauerstoffverbrauch ($0,3 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$), der sich jedoch bis zum Ende der Glucagonphase weitgehend zurückgebildet hatte (Abb. 18). Lediglich der anfängliche Anstieg im Sauerstoffverbrauch kann mit der Hemmung der Glykolyse in einen kausalen Zusammenhang gebracht werden. Hinter der

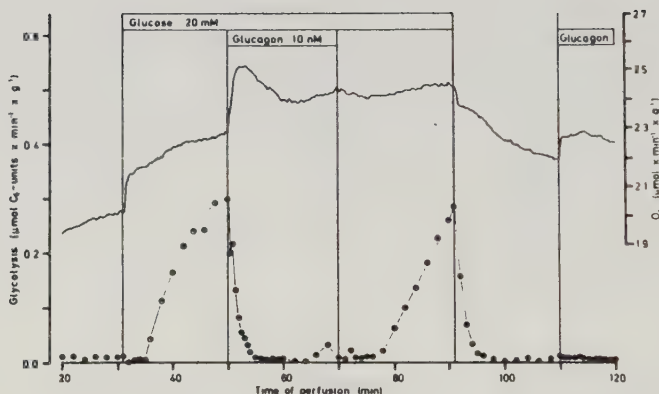


Abb. 18. Wirkung von Glucagon auf Glykolyse und Sauerstoffverbrauch in der Leber einer gehungerten Ratte in An- und Abwesenheit von exogener Glucose

Die Leber einer 48 h gehungerten Ratte wurde mit Glucose (20 mM) von min 30 - 90 perfundiert. Glucagon (10 nM) wurde in Anwesenheit von Glucose von min 50 - 70 und nach Beendigung der Glucoseinfusion von min 110 - 130 erneut gegeben. Versuchsablauf und Analytik erfolgte analog Abb. 12. Glykolyse (0,5 Lactat + 0,5 Pyruvat, ●) und Sauerstoffverbrauch (O_2 , ~~~~~) sind dargestellt.

Rückbildung des Effekts verbergen sich möglicherweise komplexe Vorgänge. Zum Beispiel könnte der Anstieg des Sauerstoffverbrauchs nach Glucosegabe bedingt sein durch eine Gluconeogenese (mit anschließender Glykogensynthese) mit Lactat und Pyruvat als Substrat, das glykolytisch aus Glucose entstanden ist. Bei Hemmung der Glykolyse durch Glucagon käme es dann zu einem verminderten ATP-Bedarf für die aus Substratmangel verminderte Gluconeogenese. Der daraus resultierende verminderte Sauerstoffverbrauch würde sich der Glucagon-bedingten Stimulation überlagern.

3.4 Glucagonwirkungen auf die Ketogenese

3.4.1 Ketogenese in Lebern gefütterter Ratten

Im Zusammenhang mit der Suche nach dem Mechanismus für die Stimulation des Sauerstoffverbrauchs durch Glucagon (siehe 3.3) wurde auch der Frage nachgegangen, ob eine Erhöhung der Geschwindigkeit von β -Oxidation und Ketogenese dabei beteiligt ist. Die in der Literatur beschriebene Stimulation der Ketogenese durch Glucagon wurde jedoch in Pilotexperimenten nicht beobachtet. Diese Diskrepanz gab Anlaß für eine größere Versuchsserie mit dem Ziel, die Perfusionsbedingungen herauszufinden, unter denen Glucagon den ihm zugeschriebenen Effekt entfaltet. In Lebern gefütterter und gehungerter Ratten wurde die Ausschüttung von 3-Hydroxybutyrat und Acetoacetat gemessen und als Parameter für die Ketogenesegeschwindigkeit genommen. Es wurde die Glucagonwirkung auf die Ketogenese aus endogenem Substrat und aus Oleat als exogenem Substrat untersucht.

3.4.1.1 Ketogenese aus endogenem Substrat

Substratfrei perfundierte Lebern gefütterter Ratten produzierten Ketonkörper nur in minimalen Mengen (um $0,1 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$; Abb. 19 - 21, 23, 30). Die Infusion von Glucagon (10 nM) bewirkte unter diesen Bedingungen einen deutlichen Anstieg der Ketogenesegeschwindigkeit, der im Vergleich zu den Änderungen der metabolischen Geschwindigkeiten im Kohlenhydratstoffwechsel jedoch gering war ($0,15 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$; Abb. 19 und Tab. 7). Dieser Effekt war langsam; nach einer Latenzzeit von 5 min erreichte er sein Maximum erst nach ca. 25 min (mit einer Halbwertszeit von etwa 5 min). Im Unterschied dazu setzte die Hemmung der Glykolyse sehr viel

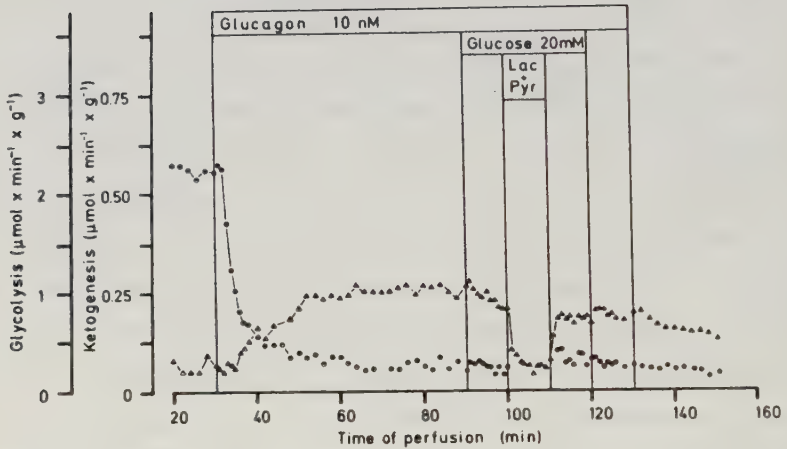


Abb. 19. Wirkungen von Glucagon, Glucose und Lactat plus Pyruvat auf die Ketogenese aus endogenem Substrat in der Leber einer gefütterten Ratte

Der substratfrei perfundierten Leber einer gefütterten Ratte wurde nach 30 min Vorperfusion Glucagon (10 nM) von min 30–130 infundiert. Glucose (20 mM) und Lactat plus Pyruvat (1 mM; 10:1) wurden von min 90–130 bzw. min 100–110 infundiert. Die Geschwindigkeiten von Ketogenese (3-Hydroxybutyrat plus Acetoacetat, $\blacktriangle$) und Glykolyse (Lactat plus Pyruvat, $\bullet$) wurden in $\mu\text{Mol}/\text{min} \times \text{g}$ angegeben.

schneller ein (Abb. 19; man beachte die unterschiedliche Spreizung der Ordinate für Glykolyse und Ketogenese!). Im weiteren Verlauf des in Abb. 19 gezeigten Experiments wurden noch Glucose und Lactat plus Pyruvat infundiert, worauf später eingegangen wird.

3.4.1.2 Ketogenese aus Oleat als exogenem Substrat

In dem in Abb. 20 dargestellten Experiment mit der Leber einer gefütterten Ratte wurde nach einer Vorperfusionsphase Oleat (0,5 mM; komplexiert mit Albumin, Oleat:Albumin = 7) infundiert. Unter diesen Bedingungen wird eine maximale Ketogenese erzielt [142]. Nach weiteren 20 min wurde mit der Glucagoninfusion begonnen (Endkonzentration 1 nM; Dauer 20 min). Neben der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs und der Glykogenolyse (stellvertretend für die folgenden Versuche, bei denen größtenteils auf die Darstellung dieser Parameter verzichtet wurde) ist in Abb. 20 die Produktion von 3-Hydroxybutyrat plus Acetoacetat gezeigt.

Die Oleatinfusion führte zu dem bekannten Anstieg im Sauerstoffverbrauch [142]; die Ketogenese wurde dabei um $0,7 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ gesteigert. Glucagon bewirkte die im Vorhergehenden beschriebene Stimulation von Glykogenolyse und Sauerstoffverbrauch (siehe 3.2 und 3.3 sowie [82, 83]). Dagegen sank die Ketogenesegeschwindigkeit zunächst deutlich ab, stieg dann jedoch wieder langsam bis zum Ausgangswert an. Nach Absetzen der Hormoninfusion waren die Effekte auf Glykogenolyse und Sauerstoffverbrauch reversibel; die Ketogenesegeschwindigkeit blieb unverändert. Das Ausbleiben einer Stimulation der Ketogenese aus Oleat bzw. das initiale Absinken der Geschwindigkeit nach Glucagongabe wurde auch unter zum Teil leicht modifizierten Bedingungen (z.B. mit 0,25 mM Oleat bei O:A = 7 und mit 0,5 mM Oleat bei O:A = 1,8) bestätigt (Abb. 25; Tab. 7).

Um auszuschließen, daß das Fehlen der Stimulation der Ketogenese durch Glucagon durch eine zu niedrige Konzentration oder zu kurze Infusionsdauer des Glucagons bedingt war, wurde ein Experiment mit der Leber einer gefütterten Ratte durchgeführt, bei dem in Anwesenheit von Oleat Glucagon in

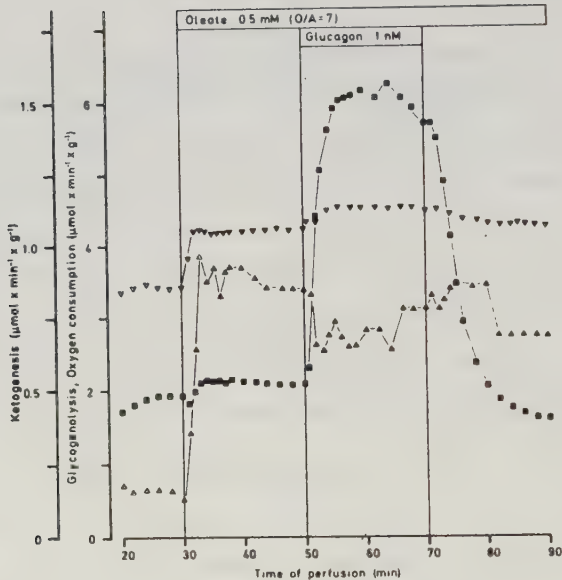


Abb. 20. Zeitlicher Verlauf der Glucagonwirkung auf Ketogenese, Sauerstoffverbrauch und Glykogenolyse in Anwesenheit von Oleat (0,5 mM) in der Leber einer gefütterten Ratte

Der Leber einer gefütterten Ratte wurde nach 30 min Vorperfusion mit Krebs-Henseleit Bicarbonatpuffer Oleat (0,5 mM; mit Albumin komplexiert, Oleat:Albumin = 7) von min 30 - 50 infundiert. Nach 50 min Perfusionsdauer wurde Glucagon (1 nM) für 20 min gegeben, worauf eine 20 min Auswaschphase folgte. Die Geschwindigkeiten der Ketogenese (3-Hydroxybutyrat plus Acetoacetat, $\blacktriangle$), des Sauerstoffverbrauchs ($\blacktriangledown$) sowie der Glykogenolyse (Glucose plus 0,5 Lactat plus 0,5 Pyruvat, $\blacksquare$) wurden als $\mu\text{Mol/min} \times \text{g}$ angegeben.

schrittweise steigenden Konzentrationen infundiert wurde (0,1 nM - 100 nM; jeweils für 20 min). Die am Ende einer Infusionsphase gemessenen Ketogenesegeschwindigkeiten sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Ein deutlicher Effekt war auch in diesem Experiment mit längeren Infusionszeiten und höhe-

ren Konzentrationen nicht zu erkennen. Statt der erwarteten Stimulation war eine leicht fallende Tendenz der Ketogenesegeschwindigkeit zu beobachten, die jedoch durch die Alterung des Leberpräparats bedingt sein kann.

3.4.1.3 Abhängigkeit des Glucagoneffekts von der Fettsäurekonzentration

3.4.1.3.1 Ketogenesegeschwindigkeit bei verschiedenen Oleat- und Albuminkonzentrationen

In perfundierten Lebern gefütterter Ratten ist Glucagon offensichtlich in der Lage, die minimale Ketogenese aus endogenem Substrat zu stimulieren, dagegen nicht die mit erheblich größerer Geschwindigkeit ablaufende Ketogenese in Anwesenheit von exogenen Fettsäuren. Es wurde berichtet, daß Glucagon in Lebern, die rezirkulierend mit Blut perfundiert wurden, die Ketogenese nur bei Konzentrationen unter 1 mM stimuliert [63]. Es besteht deshalb die Möglichkeit, daß sehr hohe Fettsäurekonzentrationen dem Glucagoneffekt entgegenwirken. Da in den beschriebenen Experimenten die Oleatkonzentration mit 0,25 mM und 0,5 mM nicht ungewöhnlich hoch war, andererseits jedoch die Albuminkonzentration weit unterhalb des physiologischen Bereichs lag, besteht der Verdacht, daß die Konzentration der freien (d.h. nicht Albumin-gebundenen) Fettsäuren entscheidend für die Ausprägung des Glucagoneffekts ist. Es wurden deshalb Experimente durchgeführt, in denen sowohl die Konzentration des Oleats als auch das Oleat:Albumin-Verhältnis abgesenkt wurden.

Ein solches Experiment - analog zu dem in Abb. 20 - ist in Abb. 21 dargestellt. Um mögliche Eigeneffekte des Albumins zu erkennen, wurde zunächst eine Vorperfusion mit 0,14 mM Albumin (1 g/dl) durchgeführt. Die an-

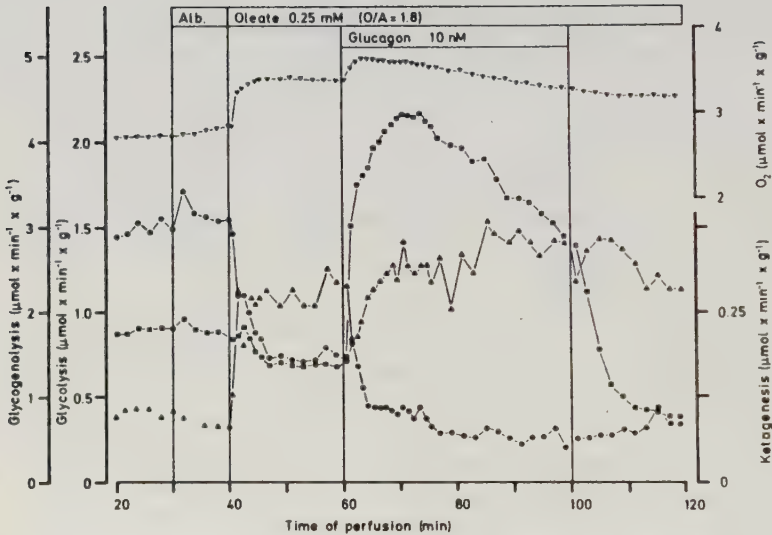


Abb. 21. Zeitlicher Verlauf der Glucagonwirkung auf Ketogenese, Glykolyse, Glykogenolyse und des Sauerstoffverbrauchs in Anwesenheit von Oleat (0,25 mM) in der Leber einer gefütterten Ratte

Die Versuchsdurchführung war analog Abb. 20. Zusätzlich wurde eine 10 min Vorperfusion mit Albumin (0,14 mM) durchgeführt. Die Oleatkonzentration betrug 0,25 mM (Oleat:Albumin = 1,8); die Glucagonkonzentration war 10 nM. Die Darstellung der Geschwindigkeiten von Ketogenese ($\blacktriangle$), Glykolyse ($\bullet$), Glykogenolyse ($\blacksquare$) und Sauerstoffverbrauch ($\blacktriangledown$) erfolgte analog Abb. 12 bzw. Abb. 19.

schließende Infusion von 0,25 mM Oleat (Oleat:Albumin = 1,8) bewirkte mit $0,2 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ einen geringeren Anstieg der Ketogenesegeschwindigkeit als bei gleicher Konzentration mit Oleat:Albumin = 7 (man vergleiche Abb. 25 und Tab. 7). Die 20 min später einsetzende Glucagoninfusion führte auch unter diesen Bedingungen zu einem initialen Abfall der Ketogenesegeschwindigkeit, die dann jedoch langsam wieder anstieg und nach 20 min ei-

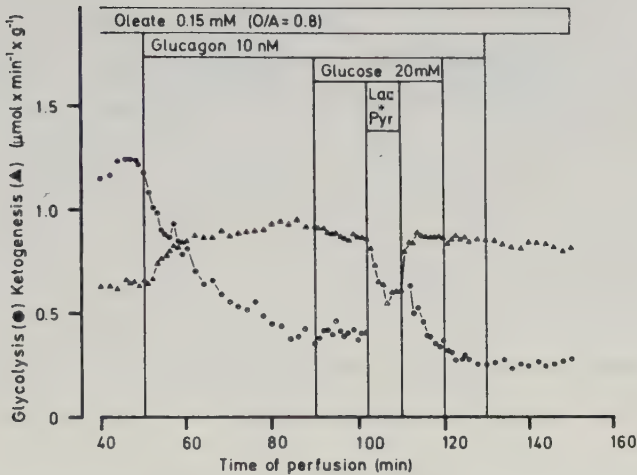


Abb. 22. Zeitlicher Verlauf der Glucagonwirkung auf Ketogenese und Glykolyse in Anwesenheit von Olate (0,15 mM) in der Leber einer gefütterten Ratte

Die Vorperfusionsphase entsprach der in Abb. 21 beschriebenen. Nach 20 min Oleatinfusion (0,15 mM; Olate:Albumin = 0,8) wurde Glucagon (10 nM) von min 50–130 infundiert. Die Infusionen von Glucose (20 mM) und Lactat plus Pyruvat (0,8 mM; 10:1) wurden von min 90–120 bzw. min 102–110 durchgeführt. Die Geschwindigkeiten von Ketogenese (▲) und Glykolyse (●) wurden analog Abb. 19 dargestellt.

nen Wert erreichte, der um 15% über dem Ausgangswert lag. Diese leicht ansteigende Tendenz wurde durch die Beendigung der Hormoninfusion unterbrochen bzw. ins Gegenteil umgekehrt. Glykogenolyse, Glykolyse und Sauerstoffverbrauch zeigten die vorher beschriebenen Veränderungen (siehe 2.2 und 2.3 sowie [82, 83]). Bemerkenswert in diesem Experiment ist allerdings, daß bereits die Infusion von Olate zu einer 50%igen Hemmung der Lactat- plus Pyruvatproduktion führte, die dann unter Glucagoneinwirkung noch weiter verstärkt wurde.

Glucagon scheint also die Ketogenese bei 0,25 mM Oleat mit Oleat:Albumin = 1,8 zu stimulieren; eine deutliche Stimulation wurde jedoch erst bei 0,15 mM Oleat mit Oleat:Albumin = 0,8 beobachtet (Abb. 22; Tab. 7). Hierbei war die Ketogenesegeschwindigkeit nach 20 min Glucagoninfusion um ca. 35% angestiegen. Der Unterschied in den experimentellen Bedingungen (Abb. 21 und Abb. 22) ist wesentlich größer als die Gesamtkonzentration an Oleat zunächst vermuten läßt. Wegen des niedrigeren Oleat:Albumin-Verhältnisses ist die Konzentration der freien (d.h. nicht Albumin-gebundenen) Fettsäuren wahrscheinlich um mehr als eine Größenordnung geringer. Auf die in diesem Experiment gemessene Glykolyse sowie die Infusion von Glucose und Lactat plus Pyruvat wird später eingegangen.

Die Abhängigkeit der Ketogenesegeschwindigkeit von der Oleatkonzentration in An- und Abwesenheit von Glucagon zeigt das in Abb. 23a dargestellte Experiment. Nach einer Vorperfusion wurde die Leber einer gefütterten Ratte mit schrittweise ansteigenden Oleatkonzentrationen (0,03 mM - 0,50 mM Oleat; O:A = 2,3; jeweils 8 min) perfundiert. Nach Absetzen der Oleatinfusion und einer längeren Auswaschphase wurde Glucagon (10 nM) infundiert und danach erneut eine Oleattitration durchgeführt. Dargestellt sind die Geschwindigkeiten der Produktion von Acetoacetat plus 3-Hydroxybutyrat sowie von Lactat plus Pyruvat.

Die Geschwindigkeit der Ketogenese zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Oleatkonzentration; sie war halbmaximal mit 0,1 mM Oleat (vgl. Abb. 24a, in der die am Ende jeder Oleatphase erreichte Ketogenesegeschwindigkeit gegen die Oleatkonzentration aufgetragen wurde). Nach Absetzen der Oleatinfusion sank die Ketogenesegeschwindigkeit rasch ab; sie lag jedoch auch nach einer längeren Auswaschphase etwas über den Werten der endogenen

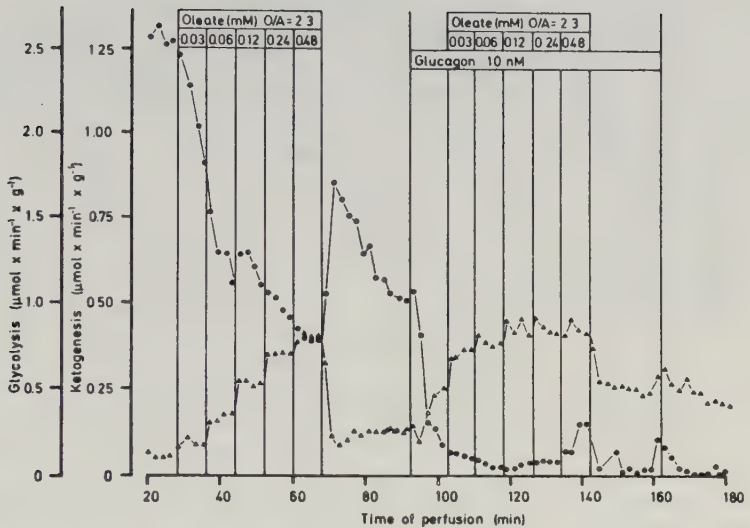


Abb. 23 a. Geschwindigkeit der Ketogenese und Glykolyse in Gegenwart verschiedener Oleatkonzentrationen in An- und Abwesenheit von Glucagon

Der Leber einer gefütterten Ratte wurde nach 28 min Vorperfusion mit Krebs-Henseleit Bicarbonatpuffer für 40 min Oleat in schrittweise steigenden Konzentrationen (0,03 mM, 0,06 mM, 0,12 mM, 0,24 mM, 0,48 mM; Oleat:Albumin = 2,3; jeweils 8 min) infundiert. Nach einer 24 min Auswaschphase wurde Glucagon (10 nM) von min 92-162 gegeben. Die Oleatinfusion wurde von min 102-142 in gleicher Weise wiederholt. Gezeigt sind Ketogenese (▲) und Glykolyse (●) dargestellt analog Abb. 19.

Ketogenese vor Oleatgabe. Die anschließende Infusion von Glucagon führte zu einer Verdopplung der Ketogenesegeschwindigkeit, sodaß die zweite Oleattitration auf einem deutlich höheren Niveau begann. Eine fast maximale Geschwindigkeit wurde jetzt bereits mit der niedrigsten Oleatkonzentration (0,03 mM) erreicht (vgl. Abb. 24 a); sie lag nur unwesentlich über der, die bei der Oleattitration in Abwesenheit von Glucagon erreicht worden

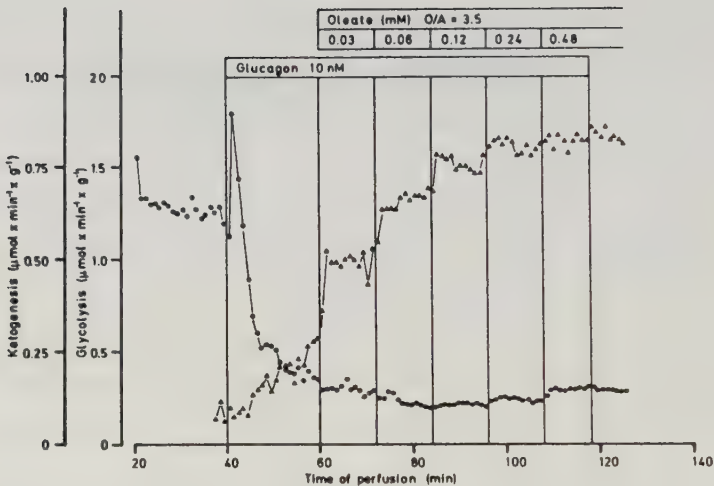


Abb. 23 b. Geschwindigkeit von Ketogenese und Glykolyse bei Infusion verschiedener Oleatkonzentrationen in Gegenwart von Glucagon

Der Leber einer gefütterten Ratte wurde nach einer 40 min Vorperfusionsphase Glucagon (10 nM) von min 40 - 118 infundiert. Ab min 60 wurde Oleat (Oleat:Albumin = 3,5) in schrittweise steigenden Konzentrationen analog Abb. 23 a infundiert (je 12 min, 0,03 mM - 0,24 mM; bzw. 17 min, 0,48 mM). Die Darstellung der Geschwindigkeiten von Glykolyse (●) und Ketogenese (▲) erfolgte analog Abb. 19.

war. Glucagon ist demnach nicht in der Lage die Maximalgeschwindigkeit der Ketogenese zu beeinflussen; die dazu notwendigen Oleatkonzentrationen werden jedoch zu deutlich niedrigeren Werten hin verschoben. Nach Absetzen der Oleatinfusion, jedoch bei weiterer Anwesenheit von Glucagon, sank die Ketogenese auf das vor Oleat mit Glucagon erreichte Niveau ab. (Um auszuschließen, daß die Vorperfusion mit Oleat einen entscheidenden Einfluß auf den beobachteten Glucagoneffekt hatte, wurde der zweite Teil des in

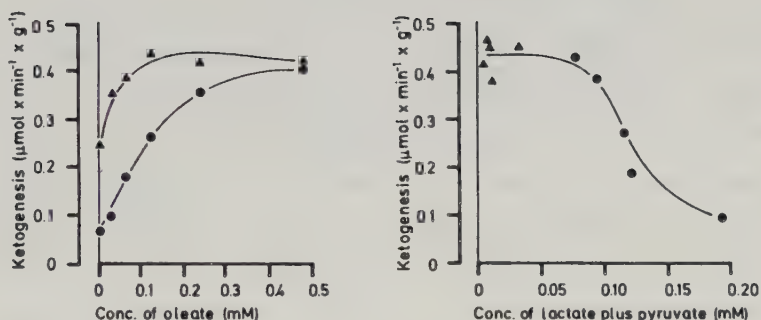


Abb. 24 a. Abhängigkeit der Ketogenesegeschwindigkeit von der Oleatkonzentration in An- und Abwesenheit von Glucagon

Die in Abb. 23 a in An- (▲) bzw. Abwesenheit (●) von Glucagon am Ende jeder Oleatphase erreichten Ketogenesegeschwindigkeiten ($\mu\text{Mol}/\text{min} \times \text{g}$) wurden gegen die jeweilig infundierte Oleatkonzentration (mM) aufgetragen.

Abb. 24 b. Zusammenhang der Geschwindigkeiten von Ketogenese und Glykolyse bei verschiedenen Oleatkonzentrationen in An- und Abwesenheit von Glucagon

Die in Abb. 24 a in Abhängigkeit von der Oleatkonzentration dargestellten Ketogenesegeschwindigkeiten wurden gegen die in Abb. 23 a in An- (▲) bzw. in Abwesenheit (●) von Glucagon gemessenen jeweiligen mittleren Perfusatkonzentrationen von Lactat plus Pyruvat (arterielle plus venöse Konzentration geteilt durch 2) aufgetragen.

Abb. 23 a beschriebenen Experiments ohne vorherige Oleatinfusion wiederholt (Abb. 23 b); die Kinetik der Ketogenesegeschwindigkeit zeigte aber auch unter diesen Bedingungen einen gleichartigen Verlauf.)

3.4.1.3.2 Zusammenfassung der Effekte von Glucagon auf die Ketogenesegeschwindigkeit

In Abb. 25 und Tabelle 7 sind die Glucagonwirkungen auf die Ketogenese aus endogenem Substrat und aus Oleat in Lebern gefütterter Ratten zusammengefaßt. Die Oleatkonzentrationen betrugen zwischen 0,02 mM und 0,5 mM; die Albuminkonzentrationen waren unterschiedlich, sodaß bei gleichen Oleatkonzentrationen ein Oleat:Albumin-Verhältnis von 7, 1,8 und 0,8 gegeben war. In Abb. 25 sind die Zeitverläufe der Änderungen in der Ketogenesegeschwindigkeit jeweils nach Beginn der Oleatinfusion dargestellt; Tab. 7 enthält die Mittelwerte (mit Standardabweichung) von gleichartigen Experimenten zu verschiedenen Zeiten nach Einsetzen der Glucagoninfusion.

3.4.1.3.3 $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{Oleat}$

Abb. 25 enthält zusätzlich die Zeitverläufe der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{Oleat}$ in den verschiedenen Experimenten. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion ist ein ungefähres Maß für den Abbau exogener Fettsäuren im Citratzyklus (ohne Kenntnis der intrazellulären spezifischen Aktivitäten geben diese Meßwerte weder einen Anhalt für die gesamte Fettsäureoxidation noch für die Citratzyklusaktivität). Nach Glucagongabe stieg die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion in den meisten Experimenten an. Der erhöhte Durchsatz von Acetyl-CoA aus exogenen Fettsäuren, der dadurch angedeutet wird, ist möglicherweise größer, weil im Falle einer Stimulation der Gluconeogenese durch Glucagon die aus Acetyl-CoA stammende Radioaktivität im Dicarbonsäurepool über Oxalacetat abgezogen und in Glucose eingebaut wird [156]. Die mögliche Steigerung der Citratzyklusaktivität stimmt mit der geringen Stimulation des Sauerstoffverbrauchs nach Glucagon überein (vgl. Abb. 21). Die initiale Hemmung der

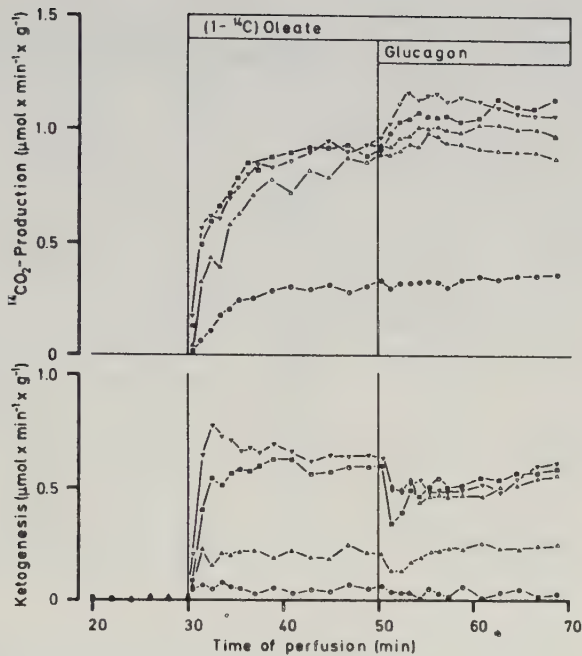


Abb. 25. Glucagoneffekt auf die Ketogenese und die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus $[1-^{14}\text{C}]\text{Oleat}$

Lebern gefütterter Ratten wurden nach einer 30 min substratfreien Vorperfusionsphase verschiedene Konzentrationen $[1-^{14}\text{C}]\text{Oleat}$ (0,5 mM; Δ , ∇ ; 0,25 mM; $\blacktriangle$, $\bullet$, $\blacksquare$) mit unterschiedlichem Oleat:Albuminverhältnis (7; Δ , ∇ , $\bullet$, $\blacksquare$; 1,8; $\blacktriangle$) infundiert. Nach weiteren 20 min wurde Glucagon (1 nM - 100 nM) für 20 min gegeben. Außerdem wurden in einem Experiment Glucose (10 mM), Lactat (10 mM) und Pyruvat (1 mM) zusätzlich infundiert ($\bullet$). Dargestellt sind die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion (oben) und die Ketogenese (unten) in $\mu\text{Mol/min} \times \text{g}$. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Ketogenesegeschwindigkeit zu Beginn der $[1-^{14}\text{C}]\text{Oleat}$ -infusion gleich 0 gesetzt, indem die jeweils in der Vorperfusionsphase gemessenen Ketogenesegeschwindigkeiten subtrahiert wurden.

Ketogenese durch Glucagon könnte ebenfalls durch eine vermehrte Oxidation von Acetyl-CoA im Citratzyklus, das dadurch der Ketogenese entzogen wird, erklärt werden.

Tabelle 7

Oleate mM	O:A	n	3-Hydroxybutyrate plus Acetoacetate		
			$\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$		
			Time following glucagon		
			0 min	2 min	20 min
0.02	7	4	0.14 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.04	0.36 $\pm$ 0.14
0.25	7	4	0.62 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.07	0.69 $\pm$ 0.11
0.50	7	4	0.74 $\pm$ 0.06	0.67 $\pm$ 0.07	0.72 $\pm$ 0.06
0.25	1.8	1	0.28	0.19	0.33
0.50	1.8	1	0.54	0.48	0.55
0.15	0.8	2	0.57 - 0.65	0.53 - 0.66	0.74 - 0.89
0	-	2	0.07 - 0.13	0.05 - 0.13	0.25 - 0.26*

* 10 min following glucagon

Tabelle 7. Abhängigkeit der Glucagonwirkung auf die Ketogenesegeschwindigkeit von der Konzentration des infundierten Oleats und dem Oleat:Albumin-Verhältnis in Lebern gefütterter Ratten

Experimente analog den in Abb. 19 - 21 gezeigten wurden verwendet. Die Geschwindigkeit der Produktion von 3-Hydroxybutyrat plus Acetoacetat ($\mu\text{Mol}/\text{min} \times \text{g}$) wurde für die Zeitpunkte 0 min, 2 min und 20 min nach Glucagongabe angegeben. Die verwendeten Oleatkonzentrationen betrugen 0,02 mM - 0,5 mM bei einem Oleat:Albumin-Verhältnis von 7 bzw. 0,15 mM - 0,5 mM bei einem Verhältnis von 0,8 - 1,8. Zum Vergleich ist die Glucagonwirkung auf die Ketogenesegeschwindigkeit in substratfrei perfundierten Lebern gezeigt. Die Werte wurden entweder als Mittelwert $\pm$ S.E.M. (n=4) oder als Einzelwerte (n=1; n=2) angegeben.

3.4.1.3.4 Mitochondrialer Redoxzustand

Die Verhältnisse der Perfusatkonzentrationen 3-Hydroxybutyrat:Acetoacetat in den in Abb. 25 und Tab. 7 beschriebenen Experimenten sind in Tab. 8 zusammengefaßt. Unter allen Bedingungen ist 2 min nach Glucagongabe ein

Tabelle 8

Oleate mM	O:A	n	3-Hydroxybutyrate:Acetoacetate		
			Time following glucagon		
			0 min	2 min	20 min
0.02	7	4	0.29 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.20	0.55 $\pm$ 0.19
0.25	7	4	1.29 $\pm$ 0.18	1.59 $\pm$ 0.42	0.66 $\pm$ 0.16
0.50	7	4	1.26 $\pm$ 0.07	1.39 $\pm$ 0.17	0.79 $\pm$ 0.09
0.25	1.8	1	0.75	0.78	0.37
0.50	1.8	1	1.86	2.27	0.65
0.15	0.8	2	0.90 - 1.32	0.90 - 2.27	0.72 - 0.76
0	-	3	0.53 $\pm$ 0.11	-	0.46 $\pm$ 0.14

Tabelle 8. Abhängigkeit der Glucagonwirkung auf den mitochondrialen Redoxzustand von der Konzentration des infundierten Oleats und dem Oleat:Albumin-Verhältnis in Lebern gefütterter Ratten

Es wurden dieselben Experimente wie in Tabelle 7 analysiert. Die zu den jeweiligen Ketogenesegeschwindigkeiten nach 0 min, 2 min und 20 min Glucagoninfusion gehörenden 3-Hydroxybutyrat:Acetoacetatverhältnisse als Maß für den mitochondrialen Redoxzustand sind gezeigt. Die Werte wurden ebenfalls als Mittelwert $\pm$ S.E.M. (n=3; n=4) bzw. als Einzelwerte (n=1; n=2) angegeben.

Anstieg dieser Verhältnisse zu erkennen, was auf einen reduzierteren Zustand des mitochondrialen NAD^+/NADH -Systems hinweist. Diese Redoxveränderung war jedoch nur vorübergehend; sie bildete sich in allen Experimenten rasch wieder zurück; unter einigen Bedingungen war sogar nach 20 min ein Redoxverhältnis unterhalb des Ausgangswertes, d.h. ein oxidierterer Zustand zu beobachten. Eine deutliche Korrelation zwischen dem Anstieg der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{Oleat}$ (Abb. 25), der initialen, vorübergehen-

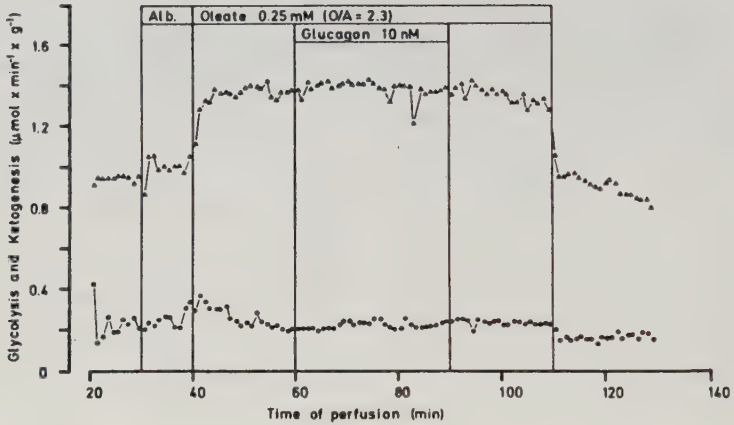


Abb. 26. Glucagon-effekt auf die Ketogenese aus Olate in der Leber einer gehungerten Ratte

Der Leber einer 48 h gehungerten Ratte wurde nach 30 min Vorperfusion mit Krebs-Henseleit Bicarbonatpuffer sowie 10 min mit Albumin (0,11 mM) Olate (0,25 mM, O:A = 2,3) von min 40 - 110 infundiert. Glucagon (10 nM) wurde von min 60 - 90 gegeben. Die Darstellung von Ketogenese (▲) und Glykolyse (●) erfolgte analog Abb. 19.

den Ketogenesehemmung (Abb. 25) und der initialen, vorübergehenden Reduktion des mitochondrialen Redoxsystems (Tab. 8) war nicht zu erkennen.

3.4.2 Ketogenese aus endogenem Substrat und aus Olate in Lebern gehungerter Ratten

In substratfrei perfundierten Lebern gehungerter Ratten beträgt die Ketogenese aus endogenem Substrat ca. $0,6 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ (vgl. Abb. 16, Abb. 28 und Abb. 29). Im Vergleich dazu sind in diesen Lebern die Geschwindigkeiten im Kohlenhydratstoffwechsel sehr gering. Die Lactat- plus Pyruvatproduktion beträgt in der Regel weniger als $0,05 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$. Wenn unter diesen Bedingungen Glucagon infundiert wurde, blieb die

Geschwindigkeit der Ketogenese unbeeinflusst (Abb. 16). Mit einer Oleatinfusion ließ sich die Ketogenese dagegen mehr als verdoppeln (Abb. 26 und 29). Daraus kann geschlossen werden, daß die Kapazität zu hohen Ketogenesegeschwindigkeiten unter diesen Bedingungen zwar vorhanden ist, das endogene Substrat aber nicht ausreicht, um diese Kapazität auszulasten. Glucagon ist offensichtlich nicht in der Lage, die Kapazität weiter zu erhöhen; denn die Hormoninfusion zeigte auch in Anwesenheit exogener Fettsäuren keine Wirkung auf die Ketogenese (Abb. 26).

3.4.3 Glykolyse und Ketogenese

In den Experimenten mit Glykogen-verarmten Lebern gehungerter Ratten, in denen - falls keine Glucose gegeben wurde - die Ausschüttung von Lactat plus Pyruvat minimal war, konnte Glucagon die Ketogenese nicht stimulieren. Eine Stimulation war dagegen in Glykogen-reichen Lebern gefütterter Ratten möglich; jedoch wurde ein deutlicher Effekt nur beobachtet, wenn das Perfusat keine exogenen Fettsäuren oder nur sehr geringe Konzentrationen an freien (nicht an Albumin gebundenen) Fettsäuren enthielt (z.B. niedrige Gesamtkonzentration von Oleat bei relativ hohen Albuminkonzentrationen). Bei hohen Konzentrationen blieb die Stimulation aus (vgl. Abb. 19-22, 30 und Tab. 7). Es fiel auf, daß Oleat die Ausschüttung von Lactat plus Pyruvat verminderte, und daß in seiner Anwesenheit der hemmende Effekt von Glucagon auf die Glykolyse geringer ausgeprägt war. Die Glykolyse scheint also bei gesteigerter Fettsäureoxidation gehemmt zu sein; die anschließende Hemmung durch Glucagon ist deshalb weniger dramatisch. Das wird deutlich, wenn man den Glucagoneffekt auf die Lactat- plus Pyruvatproduktion in Abwesenheit (siehe 3.2; z.B. Abb. 5 - 7, 9, 10) mit dem in Anwesenheit von Oleat (z.B. Abb. 22 und 27a) vergleicht. Der Rückgang in

der Lactat- plus Pyruvatausschüttung nach Glucagon erfolgte in Anwesenheit von Oleat mit deutlich langsamerer Kinetik ($t_{1/2} = \text{ca. } 6 \text{ min}$ bei $t_{1/2} = \text{ca. } 2 \text{ min}$ in Abwesenheit von Oleat). Der Abfall der Glykolyse betrug $0,5 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ gegenüber $2 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ in Abwesenheit von Oleat. Die nach längerer Glucagoneinwirkung erreichten Glykolysegeschwindigkeiten hingen von dem Niveau ab, auf das die Glykolyse bereits durch die Oleatgabe abgesenkt worden war; mit niedrigen Oleat- und relativ hohen Albuminkonzentrationen lagen die Endgeschwindigkeiten im Bereich der Werte, die in Abwesenheit von Fettsäuren erreicht wurden; mit relativ hohen Oleat- und niedrigen Albuminkonzentrationen war die Geschwindigkeit nach 20 min Glucagoneinwirkung noch doppelt so hoch.

Es ist bemerkenswert, daß die Ketogenese nur in den Experimenten durch Glucagon stimuliert werden konnte, in denen die Glykolysegeschwindigkeit - und damit die Konzentration von Lactat plus Pyruvat im Perfusat - sehr niedrige Werte erreichte, d.h. in Abwesenheit von Fettsäuren oder in Anwesenheit von niedrigen Oleat- und relativ hohen Albuminkonzentrationen (Abb. 27 a + b). Dagegen war in den Experimenten, in denen Glucagon die Glykolyse nur mäßig hemmte und die Endkonzentrationen von Lactat plus Pyruvat auf einem relativ hohen Niveau blieben, die initiale Hemmung der Ketogenese stärker ausgeprägt und die Geschwindigkeit überschritt nach längerer Glucagoneinwirkung den Ausgangswert nicht.

Diese Beobachtungen ließen den Verdacht aufkommen, daß ein Zusammenhang zwischen den Geschwindigkeiten der Lactat- plus Pyruvatproduktion und der Ketogenese bestehen könnte. Folgende Möglichkeiten für eine Beeinflussung der Ketogenese durch Glykolyse bzw. Glykolyseendprodukte werden in der Literatur diskutiert: Die Ketogenese könnte vermindert sein, indem das in

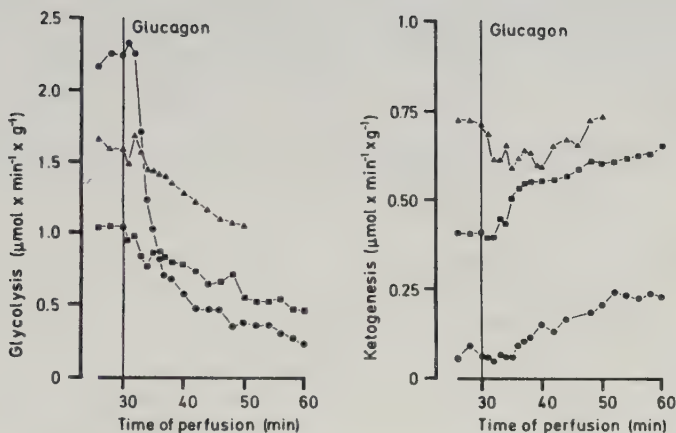


Abb. 27 a und b. Vergleichende Darstellung des Glucagon-bedingten Glykolyseabfalls und Ketogeneseanstiegs in Lebern gefütterter Ratten

Die Versuchsdurchführung entsprach der in Abb. 19 bzw. 20 beschriebenen. Gezeigt sind die Geschwindigkeitsänderungen von Glykolyse (a) und Ketogenese (b) nach Gabe von Glucagon (10 nM) in Lebern gefütterter Ratten. Das Perfusionsmedium enthielt entweder kein Substrat (●; n=1) oder mit Albumin komplexiertes Oleat (■, 0,15 mM/O:A = 0,8, n=2; ▲, 0,5 mM/O:A = 7, n=3). Die Geschwindigkeiten wurden in $\mu\text{Mol/min} \times \text{g}$ angegeben. In (b) wurde der Kurvenverlauf von 0,15 mM Oleat (■) um 0,2 $\mu\text{Mol/min} \times \text{g}$ abgesenkt, um eine übersichtlichere Darstellung zu erreichen.

der β -Oxidation entstehende Acetyl-CoA nicht für die Bildung von Acetoacetat zur Verfügung steht (d.h. Kondensation des Acetyl-CoA mit Oxalacetat zu Citrat) oder die aktivierten Fettsäuren nicht in die β -Oxidation einfließen (d.h. Veresterung der Acyl-CoA-Derivate mit Glycerol-3-Phosphat oder die Hemmung ihres Transports in die Mitochondrien infolge einer Hemmung der Carnitin-Acyltransferase I durch Malonyl-CoA). Oxalacetat, Glycerol-3-Phosphat und Malonyl-CoA sind Folgeprodukte der Glykolyse; sie entstehen aus den Triosephosphaten oder direkt oder indirekt aus Pyruvat.

Die Glykolyse kann somit die Ketogenese negativ beeinflussen; andererseits würde ihre Hemmung eine Stimulation der Ketogenese bewirken. Es ist unsicher, welcher der oben genannten Mechanismen dafür hauptsächlich verantwortlich ist.

3.4.3.1 Beeinflussung der Ketogenese durch Glucose und Lactat plus Pyruvat in An- und Abwesenheit von Glucagon

Um zu untersuchen, ob tatsächlich ein kausaler Zusammenhang zwischen der Glucagon-bedingten Hemmung der Glykolyse und der Stimulation der Ketogenese besteht, wurden Lactat und Pyruvat unter experimentellen Bedingungen substituiert, bei denen bereits vorher die Ausschüttung dieser beiden Metabolite durch Gabe von Glucagon vermindert war.

In dem Experiment in Abb. 19 wurde durch Glucagon die Ketogenese aus endogenem Substrat stimuliert und die Glykolyse aus Glykogen gehemmt. Die Infusion von Glucose führte erwartungsgemäß zu keiner vermehrten Lactat-plus Pyruvatausschüttung und hatte auch keinen Effekt auf die Ketogenese. Dagegen bewirkte die Infusion von Lactat plus Pyruvat (1,0 mM; 10:1) ein rasches Absinken der Ketogenesegeschwindigkeit auf Werte, die denen vor Glucagongabe entsprachen. Nach Absetzen der Infusion war der Effekt reversibel. Auch die Glucagon-bedingte Ketogenesestimulation in Anwesenheit von 0,15 mM Oleat als exogenem Substrat ließ sich durch Glucose nur minimal hemmen, durch Infusion von Lactat plus Pyruvat (0,8 mM; 10:1) jedoch vollständig aufheben (Abb. 22). Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß die zelluläre Verfügbarkeit von Lactat und Pyruvat die Ketogenesegeschwindigkeit beeinflusst.

Einen weiteren Hinweis liefert ein Experiment mit der Leber einer gefütterten Ratte, die mit hohen Konzentrationen an Glucose (10 mM), Lactat (10 mM) und Pyruvat (1 mM) perfundiert wurde. Sowohl die Ketogenese nach Gabe von Oleat als auch deren Stimulation durch Glucagon, die bei diesen Oleat- und Albuminkonzentrationen sonst beobachtet wurde, waren unterdrückt bzw. völlig verschwunden (Abb. 25).

Der Einfluß von Lactat plus Pyruvat auf die Ketogenese läßt sich aber wesentlich sensibler in Lebern gehungerter Ratten zeigen, die bei substratfreier Perfusion nur minimale Mengen an Lactat plus Pyruvat ausschütten, dagegen Ketonkörper in großen Mengen aus endogenem Substrat produzieren. Mit Glucose (20 mM) konnte eine Produktion von Lactat und Pyruvat ausgelöst werden; gleichzeitig sank die Geschwindigkeit der Ketogenese auf die Hälfte ab (Abb. 28). Glucagon (10 nM) bewirkte eine fast vollständige Hemmung der Lactat- plus Pyruvatproduktion und hob die durch Glucose hervorgerufene Suppression der Ketogenese wieder auf. Nach Beendigung der Glucagoninfusion waren beide Effekte voll reversibel. Die zeitliche Koinzidenz und die ähnliche Kinetik der gegenläufigen Veränderungen in Glykolyse und Ketogenese unterstützen die Hypothese, daß ein Zusammenhang zwischen beiden Prozessen besteht.

Um auszuschließen, daß bei dem Experiment in Abb. 28 β -Oxidation und Ketogenese durch die Verfügbarkeit des endogenen Substrats limitiert waren, wurde in einem ähnlichen Experiment zusätzlich Oleat als Substrat gegeben (Abb. 29), wodurch auch in der Leber einer gehungerten Ratte die Ketogenese noch gesteigert werden kann. Glucose löste auch hier eine Lactat- plus Pyruvatproduktion aus und unterdrückte die Ketogenese - allerdings nur um 35%. Wiederum waren die Zeitverläufe sehr ähnlich. Dagegen bewirkte Gluca-

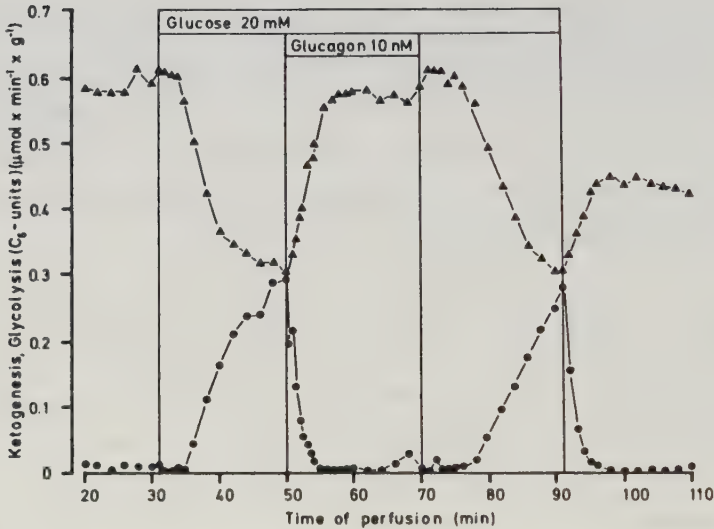


Abb. 28. Effekt von Glucose und Glucagon auf die Ketogenese aus endogenem Substrat in der Leber einer gehungerten Ratte

Der Leber einer 48 h gehungerten Ratte wurde nach 30 min substratfreier Perfusion Glucose (20 mM) infundiert. Während dieser Phase wurde Glucagon (10 nM) von min 50–70 gegeben. Die Darstellung von Ketogenese (▲) und Glykolyse (●) erfolgte analog Abb. 21.

gon keine vollständige Hemmung der Glykolyse; dementsprechend war auch die der Glucose-bedingte Hemmung der Ketogenese nur partiell aufgehoben. Die anschließende Infusion von Lactat plus Pyruvat (1 mM; 4:1) bewirkte jedoch sofort eine starke Hemmung der Ketogenese, die nach Beendigung der Infusion reversibel war.

Obwohl die Glucagoneffekte in Anwesenheit und Abwesenheit der exogenen Fettsäure quantitativ unterschiedlich waren, so zeigten sie doch die gleiche Gesetzmäßigkeit: je stärker die Glykolyse gehemmt wurde, umso mehr

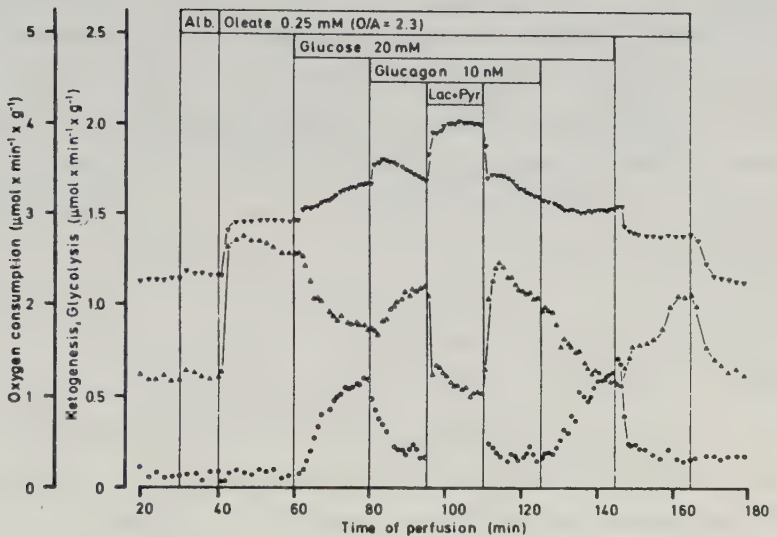


Abb. 29. Effekt von Glucagon und Lactat plus Pyruvat auf die durch Glucose gehemmte Ketogenesegeschwindigkeit in Anwesenheit von Oleat in der Leber einer gehungerten Ratte

Der Leber einer 48 h gehungerten Ratte wurde nach einer Vorperfusion mit Krebs-Henseleit Bicarbonatpuffer und Albumin (0,11 mM) Oleat (0,25 mM; Oleat:Albumin = 2,3) von min 40-165 gegeben. Während der von min 60-145 durchgeführten Glucoseinfusion (20 mM) wurden Glucagon (10 nM; min 80-125) und Lactat plus Pyruvat (1 mM; 4:1; min 95-110) infundiert. Die Darstellung von Ketogenese (▲), Glykolyse (●) und Sauerstoffverbrauch (▼) erfolgte analog Abb. 19.

ließ sich die Glucose-bedingte Unterdrückung der Ketogenese aufheben. Es scheint folglich für die Glucagonwirkung unter diesen Bedingungen ohne Belang zu sein, ob exogene Fettsäuren vorhanden sind oder nicht. Damit ist es unwahrscheinlich, daß die Stimulation der Ketogenese durch eine Glucose-bedingte Lipolyse bzw. durch eine Veränderung des Gleichgewichts von Triglyceridsynthese und -abbau zugunsten einer größeren Verfügbarkeit von Fettsäuren für die Oxidation verursacht wird.

Ein weiterer Mechanismus für die Suppression der Ketogenese durch Glykolyseendprodukte könnte in einer möglichen Stimulation der Fettsäuresynthese liegen. Dabei würde aus Pyruvat nach Carboxylierung (Oxalacetat) und oxidativer Decarboxylierung (Acetyl-CoA) Citrat entstehen, das im Cytosol sowohl das Substrat (Acetyl-CoA) als auch den Aktivator (Citrat selbst) für die Acetyl-CoA-Carboxylase liefert. Die Folge wäre eine erhöhte Konzentration des Malonyl-CoA, das wiederum über eine Hemmung der Carnitinsacyltransferase den Transport aktivierter Fettsäuren in die Mitochondrien und somit auch β -Oxidation und Ketogenese vermindern würde. Wenn also tatsächlich die Stimulation der Ketogenese unter Bedingungen, bei denen die Lactat- plus Pyruvatproduktion als Folge einer Glykolysehemmung stark abfällt, auf einer verminderten Malonyl-CoA-Produktion beruht, dann sollte sich der Glucagoneffekt auf die Ketogenese durch eine Anhebung der Malonyl-CoA-Konzentration aufheben lassen. Citrat selbst kann experimentell nicht verwendet werden, da es vom Hepatozyten nur langsam aufgenommen wird. Eine seiner beiden Funktionen (Lieferant von Substrat und Aktivator der Acetyl-CoA-Carboxylase) könnte jedoch durch Acetat simuliert werden, das nach Aktivierung zu Acetyl-CoA im Cytosol [1] das Substrat für die Acetyl-CoA-Carboxylase liefern könnte.

Es wurde deshalb in einem Experiment mit der Leber einer gefütterten Ratte, in dem vorher die Ketogenese aus Oleat durch Glucagon stimuliert worden war, Acetat infundiert (Abb. 30). Die Acetatgabe bewirkte auch bei extrem hohen Konzentrationen (10 mM) eher einen weiteren (wenn auch nur minimalen) Anstieg der Ketogenese, mit Sicherheit jedoch keinen Abfall. Zwar könnte eine Hemmung der Fettsäureoxidation als Folge der Acetatgabe durch eine Ketogenese aus Acetat als Substrat kompensiert werden; diese Möglichkeit ist aber äußerst unwahrscheinlich, da in perfundierten Lebern,

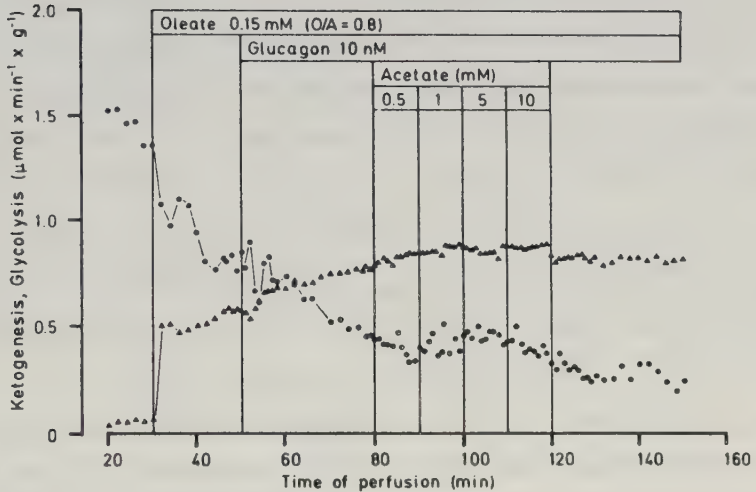


Abb. 30. Effekt von Acetat auf die durch Glucagon in Anwesenheit von Oleat stimulierte Ketogenese in der Leber einer gefütterten Ratte

Der Leber einer gefütterten Ratte wurde bei Infusion von Oleat (0,15 mM; Oleat:Albumin = 0,8; min 30–150) und Glucagon (10 nM; min 50–150) Acetat in schrittweise steigenden Konzentrationen (0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM; jeweils 10 min) infundiert. Die Darstellung von Ketogenese ($\blacktriangle$) und Glykolyse ($\bullet$) ist analog Abb. 19.

bei denen keine Ketogenese aus exogenen Fettsäuren oder endogenem Substrat vorhanden war, mit 10 mM Acetat nur eine minimale Produktion von Ketonkörpern ausgelöst wurde (Daten nicht gezeigt). Bei der Interpretation dieser Beobachtung muß jedoch berücksichtigt werden, daß keine Messung der cytosolischen Acetyl-CoA-Konzentration erfolgte und somit ein Fehlen eines Konzentrationsanstiegs nicht ausgeschlossen werden kann.

3.4.3.2 Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der extrazellulären Lactat-plus Pyruvatkonzentration und der Ketogenesegeschwindigkeit

Aus den Experimenten des vorherigen Kapitels wurde deutlich, daß Lactat plus Pyruvat - entweder als Glykolyseendprodukte oder als exogenes Substrat - die Ketogenese hemmen. Glucagon stimuliert die Ketogenese, indem es als Folge der Glykolysehemmung die Konzentrationen von Lactat plus Pyruvat senkt. Umgekehrt läßt sich der Glucagoneffekt durch Gabe von Lactat plus Pyruvat aufheben. Bei diesem Erkenntnisstand soll die in Abb. 23a/b beschriebene Beobachtung, daß in Gegenwart von Glucagon schon mit sehr niedrigen Oleatkonzentrationen eine maximale Ketogenese erzielt werden konnte, nochmals analysiert werden.

In dem Experiment in Abb. 23a wurde zunächst Oleat in steigender Konzentration gegeben; dabei sank die Ausschüttung von Lactat plus Pyruvat stark ab; (man beachte die ausgeprägte Hemmung der Glykolyse bereits bei Konzentrationen unter 0,1 mM). Glucagon bewirkte eine weitere Hemmung der Glykolyse, sodaß anschließend die erneute Oleat-Titration bei einer minimalen Lactat-plus Pyruvatproduktion erfolgte. Um die Geschwindigkeiten der Ketogenese aus Oleat in An- und Abwesenheit von Glucagon mit der jeweiligen Konzentration der Glykolyseendprodukte zu vergleichen, wurden die Meßwerte gegeneinander aufgetragen (Abb. 24b). Der Bereich, in dem bei beiden Parametern gegenläufige Veränderungen auftreten, liegt bei extrazellulären Konzentrationen zwischen 0,2 mM und 0,05 mM Lactat plus Pyruvat. Nur in diesem "Regulationsbereich" findet offensichtlich eine Wechselwirkung statt: Oberhalb von 0,2 mM ist der hemmende Effekt auf die Ketogenese maximal; unterhalb 0,05 mM ist er vollständig aufgehoben. Die Gabe von Fettsäuren bewirkt offensichtlich, daß über eine Hemmung der Glykolyse allmäh-

lich der "Regulationsbereich" erreicht und die Blockade der β -Oxidation aufgehoben wird. Wenn aber in diesem Experiment Oleat in Anwesenheit von Glucagon gegeben wurde, lagen die Lactat- plus Pyruvatkonzentrationen bereits unterhalb des "Kontrollbereichs". Oleat konnte jetzt oxidiert werden, ohne vorher die Blockade seiner Oxidation aufheben zu müssen, sodaß es bereits mit sehr niedrigen Konzentrationen zu einer maximalen β -Oxidation mit Ketogenese kam.

Das Konzept eines Regulationsbereichs legt die Fragen nahe, (1) ob es einen oberen und unteren Schwellenwert der Lactat- plus Pyruvatkonzentration gibt, bei dessen Unterschreiten die Ketogenese stimuliert wird bzw. bei dessen Überschreiten eine Hemmung einsetzt und (2) ob diese Schwellenwerte unter allen experimentellen Bedingungen bei ähnlichen Konzentrationen liegen. Um diese Fragen zu beantworten wurden zwei Wege beschritten: (1) In Glykogen-haltigen Lebern gefütterter Ratten wurde die extrazelluläre Konzentration bestimmt, die beim Einsetzen der Glucagon-bedingten Stimulation der Ketogenese vorlag (d.i. der obere Schwellenwert). (2) In Lebern gehungerter Ratten mit Ketogenese aus endogenem Substrat wurden steigende Konzentrationen von Lactat plus Pyruvat gegeben und die Konzentration bestimmt, bei der die Ketogenesehemmung einsetzt (d.i. der untere Schwellenwert). Der Regulationsbereich der intrazellulären Lactat- plus Pyruvatkonzentration soll somit über die extrazelluläre Konzentration als Indikator erfaßt werden - eine Bestimmung also, die sicherlich mit einem großen Indikatorfehler behaftet ist. Da der Indikator einmal aus dem intrazellulären Pool ausfließt, im anderen Fall aber von außen hineinfließt, werden die Indikatorfehler in entgegengesetzte Richtungen weisen. Unabhängig von den unterschiedlichen metabolischen Zuständen der Lebern wird man daher

Tabelle 9

Oleate	O:A	Stimulation of ketogenesis following glucagon		
		Time of onset	Conc. of lactate plus pyruvate at onset of stimulation	Conc. of lactate plus pyruvate at maximum of stimulation
mM	-	min	mM	mM
0	-	5	0.10	0.02
0	-	2	0.08	0.02
0	-	5	0.09	0.03
0.15	0.8	2	0.11	0.04
0.15	0.8	2	0.08	0.04

Tabelle 9. Zusammenhang der Glucagon-bedingten Ketogenesestimulation mit der extrazellulären Lactat- plus Pyruvatkonzentration

In den in Abb. 22 und 30 (in Anwesenheit von 0,15 mM Oleat; Oleat:Albumin = 0,8) und Abb. 19, 23a und 23b (in Abwesenheit von Oleat) gezeigten Experimenten wurde der Zeitpunkt des Einsetzens der Glucagonwirkung auf die Ketogenesegeschwindigkeit bestimmt. Die zu diesem Zeitpunkt sowie die bei Erreichen des maximalen Effekts gemessenen mittleren Perfusatkonzentrationen von Lactat plus Pyruvat ([arteriell + venös]: 2; mM) sind gezeigt.

allein vom experimentellen Ansatz her keine identischen Regulationsbereiche erwarten können.

Zur Beantwortung der Frage nach dem oberen Schwellenwert wurden zunächst die in Abb. 19, 22, 23a/b und 30 dargestellten Versuche analysiert. Die Zeit von der Glucagongabe bis zum Einsetzen der Ketogenesestimulation wurde bestimmt; die mittleren extrazellulären Lactat- plus Pyruvatkonzentrationen, die zu diesem Zeitpunkt und bei Erreichen der maximalen Stimulation vorlagen, wurden berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 zusammenge-

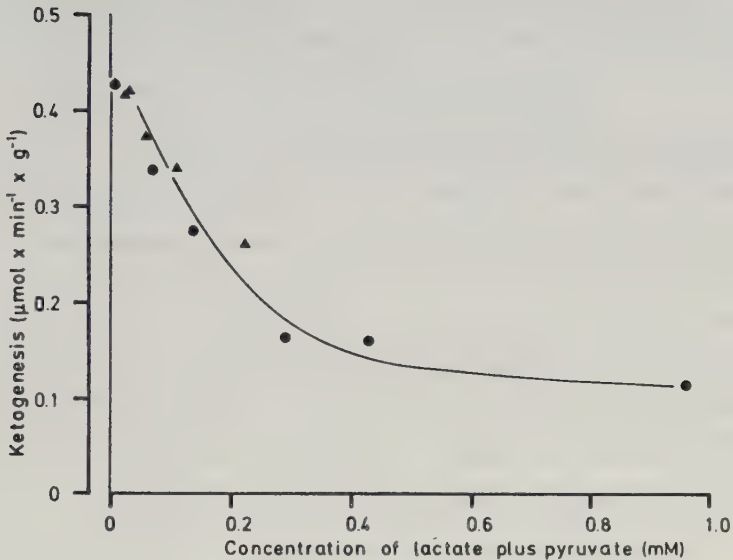


Abb. 31. Abhängigkeit der Ketogenesegeschwindigkeit von der extrazellulären Lactat- plus Pyruvatkonzentration in Lebern gehungelter Ratten

2 Lebern von 48 h gehungerten Ratten (●, ▲) wurden mit schrittweise steigenden Konzentrationen Lactat plus Pyruvat (0,02 mM - 1,0 mM; 4:1; jeweils 20 min) perfundiert. Als Ausgangswert für die Ketogenesegeschwindigkeit wurde der Mittelwert aus der vor Lactat- plus Pyruvatgabe bestehenden Geschwindigkeit genommen. Der am Ende der jeweiligen Phase der Lactat- plus Pyruvatinfusion gemessene Geschwindigkeitsabfall der Ketogenese wurde gegen die jeweilige mittlere extrazelluläre Konzentration von Lactat plus Pyruvat (arterielle plus venöse Konzentration geteilt durch 2) aufgetragen ($\mu\text{Mol}/\text{min} \times \text{g}$; mM).

faßt. In allen Experimenten setzte die Stimulation der Ketogenese erst ein, wenn die mittlere extrazelluläre Lactat- plus Pyruvatkonzentration auf etwa 0,1 mM abgesunken war. Bis zum Erreichen der maximalen Stimulation sank sie weiter bis auf 0,02 mM - 0,04 mM ab. Die Latenzzeit betrug 2 min bzw. 5 min. In den beiden Experimenten, in denen die "Schwellenkonzentration" von Lactat plus Pyruvat erst nach 5 min unterschritten wurde,

setzte auch die Ketogenesestimulation erst nach 5 min ein; diese Beobachtung unterstützt noch zusätzlich die Hypothese, daß ein Regulationsbereich mit einer oberen Schwellenkonzentration existiert.

Zur Beantwortung der Frage nach dem unteren Schwellenwert wurden in Lebern gehungerter Ratten mit Ketogenese aus endogenem Substrat Lactat plus Pyruvat in schrittweise ansteigenden Konzentrationen infundiert (Abb. 31; Lac:Pyr = 4:1; 0,025 mM - 1,0 mM; 20 min pro Phase). Die jeweils nach Einstellung eines neuen metabolischen Gleichgewichts erreichten Ketogenesegeschwindigkeiten wurden gegen die mittlere extrazelluläre Lactat- plus Pyruvatkonzentration aufgetragen. Bei Konzentrationen unterhalb 0,05 mM blieb die Ketogenese unverändert. Bei Überschreiten dieses Wertes sank die Ketogenese aus endogenem Substrat bis auf 20% des Ausgangswertes ab. Bei 0,2 mM war die Ketogenesesuppression halbmaximal. Aus diesen beiden Versuchsserien läßt sich - ohne Berücksichtigung des Indikatorfehlers - schließen, daß die Ketogenese in einem relativ engen Bereich durch die Lactat- plus Pyruvatkonzentration reguliert wird.

4 DISKUSSION

4.1 Glucagonwirkung auf Glykolyse und Glykogenolyse

4.1.1 Direkter Nachweis einer Glucagon-bedingten Hemmung des Glykolyseflusses durch Messung der Lactat- plus Pyruvatproduktion aus Glykogen in nicht-rezirkulierend perfundierten Lebern gefütterter Ratten

Eine hemmende Wirkung von Glucagon auf die hepatische Glykolyse wird seit langem aufgrund von Untersuchungen der Aktivität glykolytischer Schlüsselenzyme postuliert [24, 71, 76, 126, 165, 166]. Wenige Minuten nach Glucagongabe zum Ganztier, zur perfundierten Leber oder zu isolierten Hepatozyten wurde eine verringerte Aktivität der Phosphofructokinase und der Pyruvatkinase gefunden. In vitro gemessene Enzymaktivitäten sind jedoch nur ein Maß für die Kapazität des Substratdurchsatzes in einem gegebenen Stoffwechselzustand; sie liefern keinen Anhalt für die tatsächlich vorliegenden Geschwindigkeiten. Ein indirekter Hinweis auf einen verminderten glykolytischen Substratfluß unter Glucagon geben Experimente zum Tritium-Austausch aus radioaktiv markierter Glucose [28, 77]. Aus derartigen Messungen wurde geschlossen, daß im sogenannten "futile cycle" zwischen Fru-6-P und Fru(1,6)P₂ die durch die Phosphofructokinase katalysierte Reaktion vermindert ist, wohingegen der Substratdurchsatz durch die Fructose-1,6-Bisphosphat-Phosphatase-Reaktion erhöht ist. Der direkte Nachweis für eine Hemmung des glykolytischen Substratflusses durch Glucagon wurde jedoch erst kürzlich in dem Arbeitskreis, aus dem die vorgelegte Arbeit hervorgegangen ist, erbracht [79]. Es wurde gezeigt, daß die Lactat- plus Pyruvatausschüttung von isolierten, perfundierten Lebern nach Glucagongabe drastisch vermindert ist.

Die Schlußfolgerung, daß eine verminderte Lactat- plus Pyruvatausschüttung einen verminderten glykolytischen Substratfluß widerspiegelt, verlangt jedoch den Beweis, daß dieser Parameter ein verlässlicher Indikator für die hepatische Glykolyse ist. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt (siehe 3.1.), daß die ins Perfusat abgegebenen Glykolyseendprodukte Lactat und Pyruvat etwa 80 - 90% des glykolytischen Flusses ausmachen. Für die restlichen 10 - 20% ist vor allem die Pyruvatoxidation verantwortlich, wohingegen die Bildung von Lipiden und Aminosäuren aus Pyruvat vernachlässigbar gering ist. Auch die Wiederverwertung der Glykolyseendprodukte für die Gluconeogenese ist quantitativ unbedeutend. In Gegenwart von Glucagon ist die Pyruvatoxidation unverändert, die Gluconeogenese jedoch mäßig erhöht. Eine verminderte Lactat- plus Pyruvatausschüttung spiegelt daher tatsächlich die Hemmung des glykolytischen Flusses wieder. Wegen der höheren Wiederverwertung von Pyruvat durch die Gluconeogenese ist die Glykolysehemmung allerdings etwas geringer, als durch die Lactat- plus Pyruvatausschüttung angezeigt wird. Trotz dieser Einschränkung erwies sich die Lactat- plus Pyruvatausschüttung als ein valider Indikator für den glykolytischen Fluß, der für die Untersuchung der Glykolyseeregulation verwendet werden kann.

Der direkte Nachweis eines verminderten Substratflusses durch die Glykolyse und seine Dosis-Wirkungsbeziehung stimmt mit den Enzymaktivitätsmessungen überein. Die Hemmung war halbmaximal bei Konzentrationen um 0,2 nM Glucagon, was im Bereich der Konzentrationen liegt, die für einen halbmaximalen Effekt auf die Aktivität glykolytischer Schlüsselenzyme benötigt werden (z.B.: Inaktivierung der Phosphofructokinase 0,2 nM [126]; Phosphorylierung bei 0,06 nM [76]; Inaktivierung und Phosphorylierung der Pyruvatkinase bei 0,3 nM [124]). Die effektiven Konzentrationen liegen außer-

dem im Bereich der Konzentrationen, die in vivo im Pfortaderblut gefunden wurden (0,02 - 0,8 nM [18, 26, 118]). Die Hemmung der Glykolyse durch Glucagon scheint somit physiologisch relevant zu sein.

4.1.2 Mechanismus der Glucagon-bedingten Hemmung der Glykolyse

Als Mechanismus für die Glucagonwirkung auf die glykolytischen Schlüsselenzyme Phosphofructokinase und Pyruvatkinase wurde zunächst eine kovalente Modifizierung durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung angenommen [9, 14, 24, 44, 76, 132, 157]; allerdings wurde für die Phosphofructokinase angezweifelt, ob ihre Aktivität durch Phosphorylierung tatsächlich geändert wird [30]. Vor kurzer Zeit jedoch wurde ein neues Konzept der Glykolyse-regulation entwickelt, als der Arbeitskreis um HERS in Brüssel einen bis dahin unbekannten Aktivator der Phosphofructokinase entdeckte, der als Fructose-2,6-Bisphosphat ($\text{Fru}(2,6)\text{P}_2$) identifiziert wurde (Übersichtsarbeiten [29, 65]). $\text{Fru}(2,6)\text{P}_2$ ist wesentlich stärker aktivierend wirksam, als z.B. AMP oder Fructose-6-phosphat (Fru-6-P) [125, 171, 175, 176]; es erhöht die Affinität der Phosphofructokinase für Fru-6-P , ohne jedoch die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion zu beeinflussen [52, 65, 125, 176]; sein Wirkungsmechanismus ist wahrscheinlich eine Aufhebung der Hemmung der Phosphofructokinase durch allosterische Inhibitoren, insbesondere durch ATP [52, 171, 176] und Citrat [52]; darüberhinaus vermag $\text{Fru}(2,6)\text{P}_2$ die aktivierende Wirkung des AMP auf die Phosphofructokinase zu verstärken [52, 124, 176].

$\text{Fru}(2,6)\text{P}_2$ wird aus Fru-6-P durch eine spezifische Kinase, die 6-Phosphofructo-2-Kinase (PFK2) gebildet [40, 65, 174] und abgebaut durch eine spezifische Phosphatase, die Fructose-2,6-Bisphosphat-Phosphatase (FBPase2)

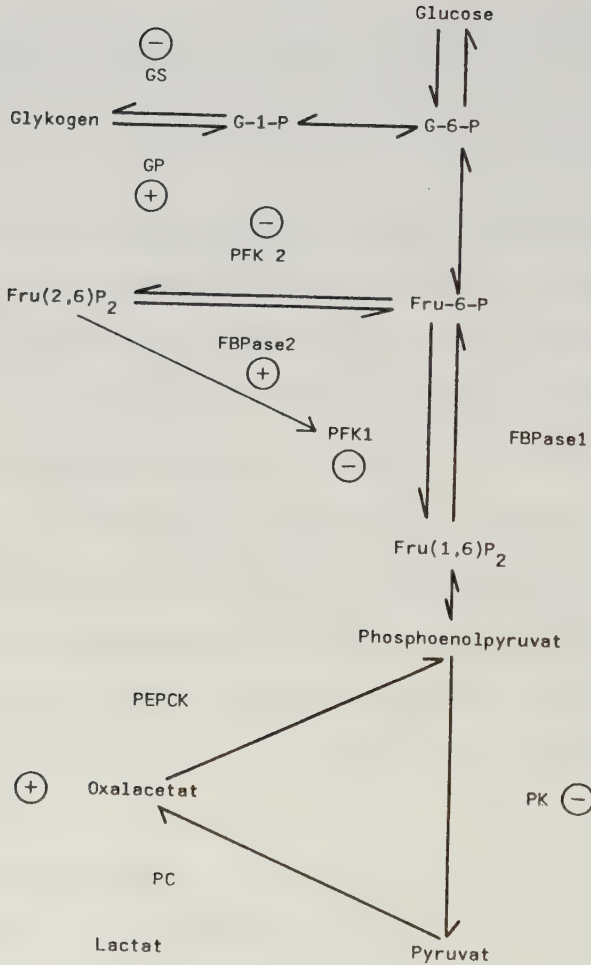


Abb. 32. Schema zur Glykolyiseregulation durch Glucagon

Stimulation (+) bzw. Hemmung (-) der Flußrichtung durch Glucagon sind angegeben.

Enzymabkürzungen: GS oder Glykogensynthetase; GP oder Glykogenphosphorylase; PFK 1 und 2 oder Phosphofructokinase 1 und 2; FBPase 1 und 2 oder Fructosebiphosphatase 1 und 2; PK oder Pyruvatcarboxylase; PECK oder Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; LDH oder Lactatdehydrogenase.

[65]; beide gehören strukturell einem einzigen Enzymkomplex an [123]. Die Aktivitäten beider Enzyme scheinen indirekt durch Glucagon reguliert zu werden: die PFK2 wird durch Phosphorylierung inaktiviert [41, 53, 131], die FBPase2 hingegen aktiviert [173]; wahrscheinlich werden diese beiden Reaktionen durch dieselbe Cyclo-AMP-abhängige Proteinkinase katalysiert, die in der Regulation des Glykogenmetabolismus eine Rolle spielt [53, 130]. Der Inaktivierung der PFK2 durch Phosphorylierung liegt wahrscheinlich ein drastischer Abfall in der Affinität des Enzyms zu seinem Substrat, Fru-6-P, zugrunde [131]. Es wurde vermutet, daß der rasche Abfall der Gewebeskonzentration von Fru(2,6)P₂ nach Glucagongabe durch die Inaktivierung bzw. Aktivierung des PFK2/FBPase2-Systems bedingt ist [65, 69, 130]. Die Fru(2,6)P₂ Konzentration kann jedoch auch durch die Fru-6-P-Konzentration reguliert werden, da eine Korrelation zwischen Hexose-6-Phosphaten und Fru(2,6)P₂ in der Leber unter verschiedenen Bedingungen beobachtet wurde [69]. Es wurde allerdings darauf hingewiesen, daß eine solche Korrelation in Gegenwart von Glucagon nicht existiert [65, 69].

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Konzept entwickelt, das eine koordinierte Kontrolle der Glykogenolyse und Glykolyse durch Glucagon postuliert: Die Aktivierung der Glykogenphosphorylase und die Inaktivierung der Phosphofructokinase (6-Phosphofructo-1-Kinase, im folgenden PFK1) wird nach Glucagoneinwirkung durch denselben Cyclo-AMP abhängigen Mechanismus eingeleitet [53, 130]. Die Cyclo-AMP-abhängige Proteinkinase bewirkt einerseits eine Kaskade von Enzym-Phosphorylierungen, an deren Ende die Interkonversion der Glykogenphosphorylase in die aktive Form (sowie der Glykogensynthetase in die inaktive Form) steht, andererseits die direkte Phosphorylierung des PFK2/FBPase2-Systems, was die Abnahme des Aktivators

der PFK1, des Fru(2,6)P₂, zur Folge hat. Dieses Konzept basiert jedoch ausschließlich auf der Untersuchung von Enzymaktivitäten und Metabolitkonzentrationen. Die Messung von glykolytischen Flußraten kann hier zusätzliche Informationen liefern.

Wie in dieser Arbeit beschrieben, ist die initiale Hemmung der Glykolyse der erste Effekt nach Beginn der Glucagoninfusion. Die Stimulierung der Glykogenolyse folgt deutlich später. Diese Ungleichzeitigkeit spricht zunächst gegen das Konzept der "koordinierten Kontrolle". Unvereinbar mit dem Konzept scheinen auch die Beobachtungen zu sein, daß die Glykogenolysekinetik eine kürzere Halbwertszeit hat als die Glykolysekinetik sowie, daß die Hemmung der Glykolyse höhere Konzentrationen erfordert als die Stimulation der Glykogenolyse.

Diese Diskrepanz kann möglicherweise durch die unterschiedlichen Mechanismen, die von der Cyclo-AMP-abhängigen Proteinkinase zur Aktivierung der Glykogenphosphorylase bzw. Inaktivierung der PFK1 führen, erklärt werden: Bei der Stimulation des Glykogenabbaus handelt es sich um eine Kaskade von Phosphorylierungsreaktionen; bei der Hemmung der Glykolyse wird dagegen nur ein Enzympaar phosphoryliert. Außerdem bestehen Unterschiede in der Art, wie das Enzym, das den eigentlichen Stoffwechseleffekt vermittelt, seine Aktivität ändert: bei der Glykogenolyse durch kovalente Modifikation (Phosphorylierung der Glykogenphosphorylase zur aktiven Form) und bei der Glykolyse durch allosterische Effekte (Abnahme der Konzentration eines allosterischen Aktivators).

4.1.3 Interpretation der Kinetik der Glykolysehemmung nach Glucagon auf der Grundlage des derzeitigen Kenntnisstandes der Enzymologie

Auf der Grundlage des Konzepts einer koordinierten Glykogenolyse-/Glykolysekontrolle läßt sich die komplexe Kinetik der Glykolysehemmung durch Glucagon (1. initiale Hemmung, die der Glykogenolysestimulation vorausgeht; 2. transienter Anstieg, gleichzeitig mit Einsetzen der Glykogenolysestimulation; 3. endgültige Hemmung) folgendermaßen erklären: Nach der Glucagon-bedingten Aktivierung der Cyclase kommt es zu einer Aktivierung der Cyclo-AMP-abhängigen Proteinkinase, die eine Aktivierung/Inaktivierung des FBPase2/PFK2-Systems bewirkt. Dadurch kommt es zu einem raschen Abfall von Fru(2,6)P₂, gefolgt von einer allosterischen Deaktivierung der PFK1, was zu einer Verminderung des Glykolyseflusses führt (initiale Hemmung der Glykolyse). Wenn dann nach einer Latenzphase in der Phosphorylierungskaskade schließlich die Glykogenphosphorylase erreicht wird, setzt abrupt die Glykogenolyse ein, es entstehen Glucosephosphate, die sich zunächst in der Zelle anstauen. Über das Hexosephosphatisomerase-Gleichgewicht steigt auch die Konzentration von Fru-6-P an. Damit wird der verminderten Affinität der phosphorylierten PFK2 zu Fru-6-P entgegengewirkt, sodaß vorübergehend wieder mehr Fru(2,6)P₂ gebildet wird und es zu einer erneuten Aktivierung der PFK1 - bei erhöhtem Substratangebot - kommt (transienter Anstieg der Glykolyse). Gleichzeitig schreitet jedoch die Phosphorylierung des PFK2/FBPase2-Systems fort, sodaß einerseits vermehrt Fru(2,6)P₂ abgebaut wird, andererseits die verminderte Affinität zu Fru-6-P nicht mehr durch ein erhöhtes Substratangebot kompensiert werden kann. Die Folge ist ein endgültiger Abfall der Fru(2,6)P₂-Konzentration und Deaktivierung der PFK1 (endgültige Hemmung der Glykolyse). Der Hemmung der Glykolyse durch Glucagon kann also nur vorübergehend (im sog. "transient state") durch Glykoge-

nolyse - vermittelt durch Fru-6-P - entgegengewirkt werden. Wenn die Glucagonwirkung voll ausgeprägt ist (im sog. "steady state"), ist eine Gegenregulation über Fru-6-P nicht mehr möglich. Die Schlußfolgerung in der Literatur, daß die Regulation der Glykolyse durch die Fru-6-P-Konzentration nur in Abwesenheit von Glucagon möglich ist [65, 69], trifft demnach nur für den "steady state" zu.

Bei diesen Überlegungen wurde der Regulationsschritt im unteren Abschnitt der Glykolyse nicht berücksichtigt, d.h. die Glucagon-bedingte Phosphorylierung und damit Inaktivierung der Pyruvatkinase. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die initiale Hemmung der Glykolyse an dieser Stelle einsetzt. Die Folge wäre eine Akkumulation von Glykolyse-Zwischenprodukten, bevor es zur endgültigen Hemmung der PFK1 kommt. Eine Entscheidung hinsichtlich der Relevanz dieser Möglichkeit läßt sich jedoch nur aufgrund der Kinetiken in den Änderungen der zellulären Konzentrationen der entsprechenden Glykolyse-Intermediate unmittelbar nach Einsetzen der Glucagonwirkung treffen. Trotz dieser Unsicherheiten erscheint die vorstehend skizzierte Sequenz von Reaktionen mit PFK1 als dem Hauptangriffspunkt für die Glykolysehemmung durch Glucagon als der wahrscheinlichere Mechanismus zur Erklärung der komplexen Kinetik.

4.2 Glucagonwirkung auf den Sauerstoffverbrauch

Glucagon steigert den Sauerstoffverbrauch der Leber in den verschiedensten Leberpräparationen [59, 122, 164, 188, 192, 193]. Zunächst wurde dieser Effekt dem erhöhten Sauerstoffbedarf für biosynthetische Stoffwechselprozesse nach deren Stimulation durch Glucagon zugeschrieben, wie z.B. Gluconeogenese oder Harnstoffproduktion [122, 188]. Da jedoch Glucagon den

Sauerstoffverbrauch auch unter Bedingungen steigert, unter denen diese biosynthetischen Prozesse in der Regel gering sind (z.B. in der substratfrei perfundierten Leber gefütterter Ratten), wurde ein direkter Effekt von Glucagon auf die Mitochondrien postuliert: Unabhängig vom ATP-Umsatz der Zelle soll Glucagon den Elektronenfluß durch die Atmungskette stimulieren. HALESTRAP berichtete, daß in Mitochondrien, die aus Lebern mit Glucagon vorbehandelter Ratten isoliert waren, der Elektronenfluß zwischen den Cytochromen c_1 und c erhöht ist [59]. Der Autor räumte später jedoch ein, daß die beschriebenen Effekte durch das experimentelle Vorgehen bedingt waren [60]. Auch SIESS und WIELAND berichteten, daß Mitochondrien von Glucagon-vorbehandelten Ratten einen erhöhten Sauerstoffverbrauch haben [154, 155]. Sie konnten jedoch zeigen, daß dieser Effekt eher Folge einer stabilisierenden Wirkung des Glucagons während der Isolierung der Mitochondrien ist als eine direkte Aktivierung mitochondrialer Prozesse [151], obwohl diese Schlußfolgerung auch angezweifelt wurde [75].

Bei den Überlegungen zur Frage, warum unter Glucagon der Sauerstoffverbrauch der Leber gesteigert ist, wurde in der Vergangenheit nicht berücksichtigt, daß es nicht nur zu einer erhöhten ATP-Produktion der Atmungskette kommt, wenn der ATP-Bedarf für biosynthetische Prozesse gesteigert ist, sondern auch, wenn durch Hemmung der Glykolyse weniger ATP im Cytosol erzeugt wird. Eine gesteigerte Atmung hätte somit den Zweck, den Ausfall der extramitochondrialen ATP-Bildung zu kompensieren.

Einen ersten Anhaltspunkt für solch einen Mechanismus lieferte die Beobachtung, daß Glykolysehemmung und Stimulation des Sauerstoffverbrauchs nach Glucagongabe fast identische Dosis-Wirkungsbeziehungen aufweisen. Außerdem besteht zwischen dem Abfall der Glykolyse und dem Anstieg des

Sauerstoffverbrauchs eine enge stöchiometrische Beziehung (1 Mol Sauerstoffmehrerverbrauch entspricht etwa 1,8 Mol vermindelter Lactat- plus Pyruvatproduktion). Unter der Annahme, daß in der Glykolyse aus Glykogen 1,5 Mol ATP/Mol des produzierten Lactats oder Pyruvats gebildet werden, läßt sich errechnen, daß 1 Mol Sauerstoffmehrerproduktion etwa 2,7 Mol ATP-Minderproduktion zu kompensieren hat. Obwohl eine solche Stöchiometrie nur eine sehr ungenaue Schätzung der Effektivität der oxidativen Phosphorylierung erlaubt, zeigt sie doch, daß das Verhältnis zwischen Glykolysehemmung und Sauerstoffmehrerverbrauch in einem vernünftigen Bereich liegt. Eine zusätzliche Bestätigung dieser Überlegungen ergaben Experimente, in welchen der glykolytische Fluß sehr gering war, z.B. in Lebern gehungerter Ratten oder bei Suppression der Glykolyse durch Äthanol. Unter diesen Bedingungen bewirkte Glucagon keine oder nur eine sehr geringe Glykolysehemmung; entsprechend gering war die Stimulation des Sauerstoffverbrauchs.

Es muß einschränkend gesagt werden, daß die Wechselwirkung von Glykolyse und Atmungskette zwar unter diesen experimentellen Bedingungen der entscheidende Mechanismus für den gesteigerten Sauerstoffverbrauch ist, weil die nicht-rezirkulierend perfundierte Leber durch hohe Glykolysegeschwindigkeiten charakterisiert ist. In vivo wird diese Wechselwirkung jedoch nicht so stark ausgeprägt sein, obwohl Situationen vorstellbar sind, in denen dieser Mechanismus die hepatische Atmung erheblich steigert. Eine derartige Situation ist z.B. die akute Stress-induzierte Hyperglucagonämie [11, 95, 178] im postprandialen Zustand.

4.3 Glucagonwirkung auf die Ketogenese

Erhöhte Konzentrationen von Acetoacetat und 3-Hydroxybutyrat im Blut, z.B. im Hungerzustand und beim Diabetes mellitus, gehen in der Regel einher mit erhöhten Serumkonzentrationen freier Fettsäuren als Folge einer gesteigerten Lipolyse im Fettgewebe. Die hepatische Ketonkörperproduktion wurde deshalb zunächst als eine Funktion der Fettsäurekonzentration angesehen [8, 51, 61, 88, 120]. Als jedoch beobachtet wurde, daß hohe Fettsäurekonzentrationen vorkommen können, ohne daß auch die Ketonkörperkonzentration wesentlich erhöht ist [37, 145, 189], und daß die Geschwindigkeit der Ketogenese aus exogenen Fettsäuren in perfundierten Lebern davon abhing, ob das Tier gefüttert, gehungert oder diabetisch war [97-99, 172], etablierte sich die Hypothese einer zusätzlichen intrahepatischen Regulation der Ketogenese. Die Glucagon-bedingte Ketogenesesteigerung [7, 63, 78, 94, 110, 112] wurde daraufhin auf mögliche intrahepatische Angriffspunkte untersucht.

4.3.1 Mechanismus einer intrahepatischen Regulation der Ketogenese

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt ist, wurden in der Vergangenheit mehrere Angriffspunkte für die Regulation der Ketogenese diskutiert:

1. auf der Stufe des Glycerol-3-Phosphats, bedingt durch die Konkurrenz von Veresterung und Oxidation der Acyl-CoA-Derivate;
2. auf der Stufe des Citratzyklus, bedingt durch ein Ungleichgewicht von Acetyl-CoA-Produktion in der β -Oxidation und Acetyl-CoA-Verbrauch im Citratzyklus;
3. auf der Stufe des Hydroxymethylglutaryl-CoA-Zyklus (HMG-CoA-Zyklus);
4. auf der Stufe des Transports des Acyl-CoA in die Mitochondrien über das Carnitin-Acyltransferase-System.

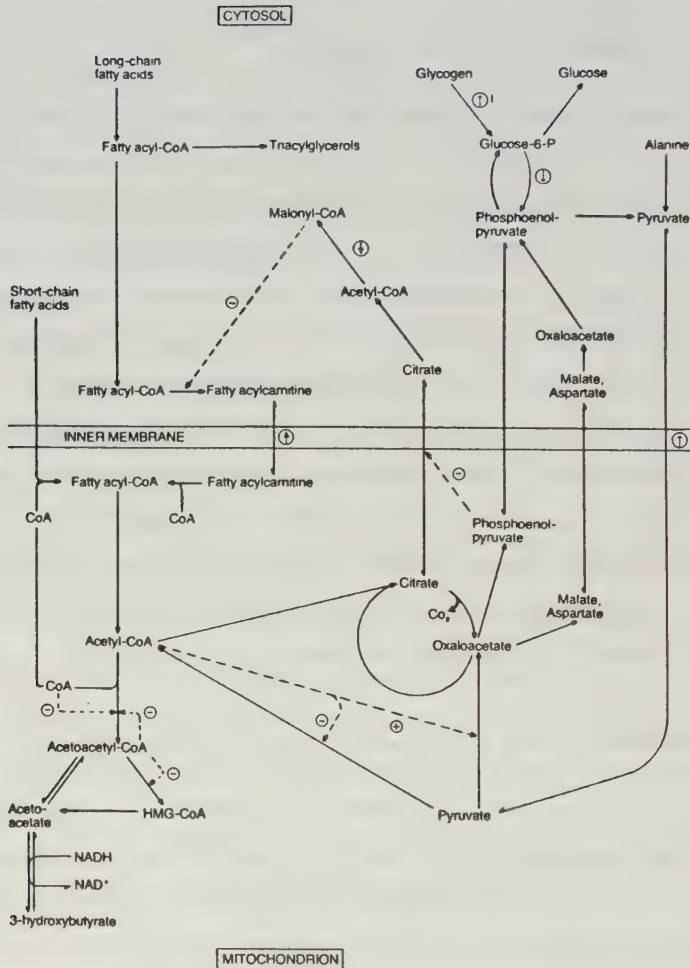


Fig. 1. Relationships between ketogenesis and other metabolic pathways in the liver. Solid lines denote pathways, individual enzyme-catalyzed reactions or carrier-mediated transport across the mitochondrial inner membrane. Broken lines denote effects of intermediates on enzyme or carrier activities ($\oplus$ for activation, $\ominus$ for inhibition). The effects of glucagon on various processes are denoted by $\oplus$ or $\ominus$ for activation or inhibition, respectively. In the interests of clarity certain pathways are denoted by single arrows, and not all components of the reactions are included.

Veresterung und Oxidation aufgenommener Fettsäuren zeigen ein reziprokes Verhalten [5, 97, 99, 119], sodaß zunächst angenommen wurde, die Kapazität zur Veresterung bestimme, ob die Fettsäuren vorwiegend verestert oder oxidiert werden [51, 97, 181]. Die Glycerol-3-Phosphat-Konzentration soll dabei der entscheidende Faktor sein [170]. Es wurde tatsächlich beobachtet, daß unter Glucagoneinwirkung der Gewebsgehalt an Glycerol-3-Phosphat absinkt; entsprechend war die Veresterung vermindert sowie die Oxidation gesteigert [96]. Gegen diese Veresterungshypothese spricht allerdings, daß sich der Glycerol-3-Phosphat-Gehalt in Lebern gehungerter und gefütterter Ratten nicht wesentlich, die Geschwindigkeiten von Veresterung und Oxidation jedoch erheblich unterscheiden [99, 177], und daß nach Hemmung der Oxidation durch (+)-Dekanoyl-Carnitin die Triglycerid-Synthese (wahrscheinlich bei gleichbleibender Glycerol-3-Phosphat-Konzentration) stark ansteigt [107].

Hinweise für einen Angriffspunkt beim Transport langkettiger Fettsäuren in die Mitochondrien lieferte das unterschiedliche Verhalten verschiedener Fettsäuren. Im Gegensatz zu Oleat [99] wurden mit Oktanoat, das als mittelkettige Fettsäure unabhängig vom Carnitin-Acyltransferase-System [85, 86] ins Mitochondrium gelangt [51] nur geringe Unterschiede der Fettsäureoxidationsgeschwindigkeit in Lebern gefütterter, gehungerter und diabetischer Ratten beobachtet [51, 98], während sein Carnitinester sich ähnlich wie Oleat verhielt [100]. Cyclo-AMP - als 'second messenger' des Glucagons - kann die Ketogenese aus Oleat [63, 84] stimulieren, jedoch nicht die aus Oktanoat [128] oder Butyrat [186]. Diese Beobachtungen, die eine Regulation über das Carnitin-Acyltransferase-System durch Glucagon nahelegen, sprechen jedoch gleichzeitig gegen einen primären Angriffspunkt des Hormons bei nachgeordneten Reaktionen (d.h. Citrat- oder HMG-CoA-Zyklus).

Bei der Suche nach dem Mechanismus, über den an der Carnitin-Acyltransferase sowohl Fettsäureoxidation als auch Ketogenese reguliert werden könnten, entdeckten MCGARRY und FOSTER die inhibitorischen Eigenschaften des Malonyl-Coenzym A [105]. Dieser Intermediat der Fettsäuresynthese (Produkt der Acetyl-CoA-Carboxylase-Reaktion) erwies sich als ein äußerst potenter, wahrscheinlich kompetitiver Inhibitor der auf der Außenseite der Mitochondrienmembran lokalisierten Carnitin-Acyltransferase (CAT I); er hemmt in vitro den Fettsäuretransport halbmaximal bei Konzentrationen um $1 \mu\text{M}$ [104, 106], also im Bereich der in vivo Konzentrationen [101, 108]. Nach Glucagonwirkung in vivo [34] sowie in vitro (isolierte Hepatozyten [33, 109]) kommt es zu einem starken Abfall der Malonyl-CoA-Konzentration. Nach dieser Hypothese würde Glucagon die Oxidation langkettiger Fettsäuren und damit auch die Ketogenese über eine Enthemmung der CAT I stimulieren. Der Abfall der Malonyl-CoA-Konzentration könnte indirekt durch die Glucagonbedingte Hemmung der Glykolyse oder direkt durch die Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase (z.B. durch eine Cyclo-AMP-abhängige Phosphorylierung [103, 190]) verursacht werden.

4.3.2 Abhängigkeit der Ketogenesestimulation durch Glucagon vom metabolischen Zustand der Leber sowie von der angebotenen Fettsäurekonzentration

Es wird allgemein angenommen, daß Glucagon die Ketogenese stimuliert. Dennoch wurde in Pilotexperimenten zu Beginn der vorliegenden Arbeit ein derartiger Effekt in der isolierten, nicht-rezirkulierend perfundierten Rattenleber nicht gesehen, obwohl andere bekannte Glucagonwirkungen (z.B. auf Glykogenolyse und Glykolyse) eindeutig vorhanden waren. Es wurde deshalb untersucht, welche Bedingungen erfüllt sein müssen, damit Glucagon auch in

diesem Versuchsmodell die Ketogenese zu stimulieren vermag. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Glucagon keinen Effekt auf die Ketogenese in Lebern gehungerter Ratten hat, dagegen aber in Lebern gefütterter Ratten, auch wenn dort - absolut gesehen - der Effekt gering war. Er war relativ groß bei einer Ketogenese aus endogenem Substrat; er verschwand allerdings bei höheren Fettsäurekonzentrationen, was auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde [63, 102].

4.3.3 Abhängigkeit der Ketogenese von der zellulären Verfügbarkeit von Lactat und Pyruvat: Mechanismus der Ketogenesestimulation als indirekte Glucagonwirkung

Glucagon führte regelmäßig nur dann zu einer Stimulation der Ketogenese, wenn es eine Glykolysehemmung bewirkte und dadurch die extrazelluläre Lactat- plus Pyruvatkonzentration auf Werte unter 0,1 mM absenkte. Fehlte die Hemmung der Glykolyse (entweder im Hungertier aus Mangel an Substrat oder wenn die Glykolyse bereits durch Fettsäuren gehemmt war), war auch keine Ketogenesesteigerung zu beobachten. Das war auch dann der Fall, wenn Lactat und Pyruvat über die Pfortader substituiert wurden und es somit - trotz Glykolysehemmung - zu keinem nennenswerten Abfall der zellulären Lactat- plus Pyruvatkonzentration kommen konnte. Andererseits läßt sich die Ketogenese im Hungertier durch Glucoseinfusion hemmen, da Glucose glykolytisch zu Lactat und Pyruvat abgebaut wird. Glucagon hebt diese Hemmung auf.

Aus diesen Beobachtungen läßt sich schließen, daß der primäre Angriffspunkt für die Glucagonwirkung auf die Ketogenese in der Reaktionssequenz zwischen Glucose und Pyruvat liegen muß, und dort, wie im vorstehenden

Kapitel diskutiert, bei der PFK-Reaktion zu suchen ist. Die Wirkung auf die Fettsäureoxidation bzw. Ketogenese wäre dann nur sekundär. (Eine direkte Stimulation der hepatischen Lipolyse durch Glucagon ist unwahrscheinlich, da eine deutliche Aktivität einer hormonsensitiven Lipase - analog der im Fettgewebe - in der Leber nicht nachgewiesen werden konnte [38]).

Die folgende Sequenz ist denkbar:

1. Der primäre Angriffspunkt des Glucagons liegt auf den Stufen Phosphofructokinase/Fructose-1,6-Bisphosphat-Phosphatase und Pyruvatkinase/Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase. Die Glykolyse wird gehemmt und gleichzeitig die Gluconeogenese stimuliert.
2. Durch verminderte Produktion (Glykolyse) und gleichzeitig erhöhte Utilisation (Gluconeogenese) kommt es zu einem Pyruvatmangel.
3. Da dem Citratzyklus weniger Oxalacetat angeboten wird (Substratmangel der Pyruvatcarboxylase sowie erhöhte Utilisation durch Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) wird weniger Citrat in den Mitochondrien synthetisiert und in das Cytosol transportiert. (Der Citrattransport könnte noch zusätzlich durch eine erhöhte Phosphoenolpyruvat-Konzentration [67, 149] gehemmt werden [117, 194].)
4. Die Folge ist eine erniedrigte Citrat-Konzentration im Cytosol. (Ein Abfall des Citratgehaltes nach Glucagoneinwirkung wurde in Hepatozyten nachgewiesen [109].)
5. Mit Citrat verschwindet sowohl der Substrat-Precursor als auch der Aktivator der Acetyl-CoA-Carboxylase. (Die physiologische Relevanz der Aktivatorfunktion des Citrats ist allerdings umstritten [80]). Es wird folglich weniger Malonyl-CoA gebildet. (Ein Abfall des Malonyl-CoA-Gehaltes nach Glucagoneinwirkung wurde in Hepatozyten nachgewiesen [33, 34, 109].)

6. Durch das Absinken der Konzentration ihres Inhibitors, Malonyl-CoA, wird die CAT I enthemmt.

7. Es wird mehr Acetyl-CoA gebildet als vom Citratzyklus oxidiert werden kann (sein Substratdurchsatz könnte sogar zusätzlich infolge Oxalacetat-Mangels vermindert sein, obwohl die Erhöhung der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus $[1-^{14}\text{C}]\text{Oleat}$ nach Glucagon dagegen spricht). Das vermehrt anfallende Acetyl-CoA wird über den Hydroxymethylglutaryl-CoA-Zyklus abgeleitet, was eine erhöhte Produktion von Acetoacetat und 3-Hydroxybutyrat zur Folge hat.

4.3.4 Synergismus von Oleat und Glucagon im Rahmen der Ketogeneseregulation

Die Dosis-Wirkungskurve von Fettsäureoxidation (einschließlich Ketogenese) nach Fettsäuregabe spiegelt nicht nur den Substrateffekt wider, sondern auch die Aktivierung des Prozesses durch die dabei entstehenden Metabolite. Erhöhte Konzentrationen von Acyl-CoA (zusammen mit erniedrigten Coenzym A-Konzentrationen) können die Affinität der Acetyl-CoA Carboxylase zu Acetyl-CoA verringern [80] und damit über ein Absinken der Malonyl-CoA-Konzentration die Inhibition der CAT I aufheben. Den gleichen Effekt hat auch die Hemmung der Glykolyse, die ebenfalls nach Fettsäuregabe beobachtet wird ([142]; Kap. 3.4). Tatsächlich wird ein Abfall der Malonyl-CoA-Konzentration unter Fettsäuren beobachtet [102].

Mit Glucagon ließ sich die maximale Geschwindigkeit der Ketogenese nicht steigern; das Hormon bewirkte lediglich, daß die Maximalgeschwindigkeit bereits mit niedrigeren Fettsäurekonzentrationen erreicht wurde. Offensichtlich nimmt Glucagon die aktivierende Komponente nach Fettsäuregabe

vorweg, indem es ebenfalls durch Hemmung der Glykolyse mit nachfolgendem Abfall der Malonyl-CoA-Konzentration die CAT I deinhibiert. Die Fettsäuren treffen somit auf ein aktiviertes System, sodaß bereits bei niedrigen Konzentrationen höhere Oxidationsgeschwindigkeiten möglich sind als in Abwesenheit von Glucagon. Die synergistischen Wirkungen von Fettsäuren und Glucagon haben offensichtlich den gleichen Angriffspunkt und sind nicht-additiv, d.h. Glucagon bleibt ohne Effekt, wenn die CAT I durch hohe Fettsäurekonzentrationen bereits vollständig aktiviert ist. Im Einklang mit diesen Überlegungen steht die Beobachtung, daß Fettsäuregabe in Anwesenheit von Glucagon zu keinem weiteren Absinken der Malonyl-CoA-Konzentration mehr führt [102].

4.3.5 Physiologische Relevanz der intrahepatischen Ketogeneseregulation durch Glucagon

Bei der Frage einer möglichen Übertragung der Befunde an der perfundierten Rattenleber auf die *in vivo* Situation müssen zunächst Perfusat- und Serumkonzentrationen verglichen werden. In den vorgelegten Untersuchungen wurde eine Stimulation der Ketogenese durch Glucagon, wenn auch minimal, nur bei Oleatkonzentrationen unter 0,2 mM beobachtet. Die Serumkonzentrationen der Fettsäuren liegen - in Abhängigkeit vom metabolischen Zustand - im Bereich von 0,1 mM - 0,8 mM [8, 87, 107, 187]; im Hungerzustand und bei Diabetes mellitus können die Konzentrationen jedoch noch wesentlich höher sein [8, 51, 61, 120].

Glucagon bewirkte außerdem nur dann eine Steigerung der Ketogenese, wenn es infolge Hemmung der Glykolyse die Verfügbarkeit von Pyruvat verringerte. Der Bereich, in dem die Lactat- plus Pyruvatkonzentration einen deut-

lichen Einfluß auf die Ketogenesegeschwindigkeit hatte, lag zwischen 0,05 mM und 0,2 mM; wenn dem Perfusat mehr als 0,5 mM Lactat plus Pyruvat zugesetzt wurde, war ein Glucagoneffekt auf die Ketogenesegeschwindigkeit nicht mehr zu beobachten. Das sind Konzentrationen, die weit unter denen im Serum liegen. (Im peripheren Blut wird die Konzentration von 1 mM Lactat kaum unterschritten [4, 66, 185]; im Pfortaderblut liegen die Konzentrationen wahrscheinlich aufgrund der glykolytischen Spaltung von Glucose in der Darmmukosa unter allen Ernährungsbedingungen höher.)

Auch wenn Perfusat- und Serumkonzentrationen von Fettsäuren und Lactat plus Pyruvat hinsichtlich ihrer metabolischen Auswirkungen schwer zu vergleichen sind (unterschiedliche Albuminkonzentrationen, unterschiedliche Durchströmungsgeschwindigkeiten, Anwesenheit anderer Metabolite und Faktoren etc.), so läßt sich dennoch sagen, daß die in vivo Konzentrationen außerhalb des Bereiches liegen, in dem Glucagon in vitro eine intrahepatische Ketogeneseregulation zeigt. Die Glucagoneffekte auf die Ketogenese in der perfundierten Rattenleber sind sicherlich keine Artefakte; sie zeigen die potentiellen Wirkungen und Interaktionen im zellulären Stoffwechsel, die möglicherweise nur unter extremen Bedingungen verwirklicht werden. Wenn dagegen Glucagon in vivo die Ketogenese kurzfristig stimuliert, dann geschieht das wahrscheinlich nicht über eine direkte Einwirkung des Hormons auf die Leber, sondern indirekt über ein gesteigertes Fettsäureangebot. Das Zielorgan ist dabei das Fettgewebe, in dem es nach Stimulation der Hormon-sensitiven, Cyclo-AMP-abhängigen Lipase zu einer Steigerung der Lipolyse kommt [23, 35, 115]. Die Leber scheint im Rahmen der Kurzzeitre-gulation durch Glucagon nur hinsichtlich des Kohlenhydrat-Stoffwechsels ein Zielorgan zu sein.

4.4 Zusammenfassende Schlußbemerkung

Die Leber ist das Zielorgan des Glucagons hinsichtlich der Kurzzeitregulation des Kohlenhydratstoffwechsels: Glykogenolyse und Gluconeogenese werden stimuliert, die Glykolyse wird gehemmt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Kinetiken der Glykogenolysestimulation und der Glykolysehemmung analysiert. Für die Glykolyse wird als Angriffspunkt die Reaktion der Phosphofructokinase diskutiert, die wahrscheinlich indirekt über einen Abfall des $\text{Fru}(2,6)\text{P}_2$ gehemmt wird.

Dadurch kommt es:

1. zu einem Abfall der Glykolysegeschwindigkeit mit verminderter Ausschüttung von Lactat und Pyruvat;
2. zu einer verminderten cytosolischen ATP-Produktion, die zu einem kompensatorischen Anstieg der mitochondrialen Produktion von ATP mit Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs führt;
3. zu einer verminderten Verfügbarkeit von Pyruvat, die möglicherweise über einen Abfall der Malonyl-CoA-Konzentration zu einer Enthemmung der CAT I und somit zu einer Stimulation (Enthemmung) der Ketogenese führt.

Der Glucagoneffekt auf die Ketogenese zeigt - im Rahmen der Kurzzeitregulation - wahrscheinlich nur eine potentielle Interaktion im zellulären Stoffwechsel ohne wesentliche physiologische Relevanz auf. Die Bedingungen für die Hemmung der Glykolyse und ihre Wechselwirkung mit der Zellatmung sind dagegen in einem Bereich, der eine Übertragung der Aussagen auf in vivo Verhältnisse erlaubt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkungen von Glucagon auf Glykogenolyse, Glykolyse, Sauerstoffverbrauch und Ketogenese, deren Kinetiken sowie die Interaktionen dieser Stoffwechselprozesse wurden in der isolierten, nicht-rezirkulierend perfundierten Rattenleber untersucht.

Die folgenden Befunde wurden erhoben:

1. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen entspricht die Abgabe von Lactat plus Pyruvat ins Perfusat 80% - 90% des glykolytischen Flusses; die restlichen 10% - 20% entfallen auf die Pyruvatoxidation; Glucose-, Lipid- und Aminosäurensynthese aus Pyruvat sind vernachlässigbar gering.
2. Glucagon hemmt die Lactat- plus Pyruvatproduktion um 70% (Futtermitteltier; Glykogen als Substrat) bzw. 90% (Hungertier; Glucose als Substrat). 10% bis 20% dieser Hemmung sind auf gesteigerte Gluconeogenese aus Pyruvat zurückzuführen; die tatsächliche Hemmung des glykolytischen Flusses ist deshalb etwas geringer.
3. Die Kinetik der Glucagon-bedingten Glykolysehemmung (halbmaximal bei 0,2 nM Glucagon) zeigte nach einer konzentrationsabhängigen Latenzzeit einen initialen Abfall der Glykolysegeschwindigkeit, dem ein transients Anstieg folgte (koinzidierend mit dem Einsetzen der Glykogenolysestimulation), bevor die endgültige Hemmung der Glykolyse einsetzte. Die Kinetik der Glykogenolysestimulation (halbmaximal bei 0,06 nM) läßt sich als eine Funktion beschreiben, die aus zwei exponentiellen Kinetiken mit unterschiedlichen Halbwertszeiten zusammengesetzt ist.
4. Glucagon bewirkt in Lebern gefütterter Ratten eine Stimulation des Sauerstoffverbrauchs, der mit der Hemmung der Glykolyse koinzidiert und dieselbe Konzentrationsabhängigkeit hat (beide Effekte sind halbmaximal

bei 0,2 nM Glucagon). Zwischen den Veränderungen beider Parameter nach Glucagongabe läßt sich eine stöchiometrische Beziehung mit enger linearer Korrelation nachweisen.

5. Glucagon steigert die Ketogenesegeschwindigkeit in Lebern gefütterter Ratten; die Steigerung, die - geringer ausgeprägt - auch in Abwesenheit exogener Fettsäuren beobachtet wurde, war abhängig von der infundierten Oleatkonzentration und dem Oleat-/Albuminverhältnis. Sie war jedoch unter allen Bedingungen quantitativ wesentlich geringer ausgeprägt als die mit Oleat allein erreichten Ketogenesesteigerungen; das Hormon bewirkte keine Erhöhung der mit Fettsäuren erreichbaren Maximalgeschwindigkeit, sondern verschob lediglich die Dosis-Wirkungskurve der Fettsäuren zu niedrigeren Werten. Eine Stimulation der Ketogenese erfolgte darüberhinaus nur, wenn Glucagon gleichzeitig in der Lage war, die Lactat- plus Pyruvatproduktion zu hemmen. In Glykogen-verarmten Lebern gehungerter Ratten stimulierte Glucagon die Ketogenese nicht; es war jedoch in der Lage, eine Glucose-bedingte Hemmung der Ketogenese infolge Glykolysehemmung aufzuheben.

Aus diesen Befunden lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. In der hämoglobinfrei, nicht-rezirkulierend perfundierten Rattenleber ist die Ausschüttung von Lactat und Pyruvat ins Perfusat ein valider Indikator für den glykolytischen Fluß und eignet sich daher zur Untersuchung der Glykolyseeregulation.
2. Die Glucagon-bedingte Stimulation der Glykogenolyse und Hemmung der Glykolyse erfolgen bei Konzentrationen, die im Bereich der in vivo beobachteten liegen; eine physiologische Relevanz der beiden Effekte ist somit wahrscheinlich.
3. Die komplexe Kinetik der Hemmung des glykolytischen Flusses nach Glucagon läßt sich durch Interaktionen der Glykogenolysestimulation und der

Glykolysehemmung erklären: Durch Hemmung der PFK2 (und Stimulation der FBPase2) kommt es zu einem Abfall der Fru(2,6)P₂-Konzentration und in der Folge zu einer verminderten Aktivität der PFK1; die dann abrupt einsetzen- de Glykogenolysestimulation erhöht die Fru-6-P-Konzentration und führt über einen Substrateffekt zu einem vorübergehenden Anstieg der Fru(2,6)P₂-Konzentration sowie der Aktivität der PFK1. Schließlich schreitet jedoch die Inaktivierung/Aktivierung des PFK2/FBPase2-Systems fort, sodaß auch bei erhöhtem Substratangebot die Bildung von Fru(2,6)P₂ abfällt und somit die PFK1-Aktivität und damit die Geschwindigkeit des glykolytischen Flusses endgültig abfällt.

4. Der Anstieg des hepatischen Sauerstoffverbrauchs nach Glucagon ist durch einen Abfall der cytosolischen ATP-Produktion infolge Glykolysehemmung mit kompensatorischem Anstieg der mitochondrialen energieliefernden Prozesse (Atmungskette) bedingt.

5. Die Glucagon-bedingte Glykolysehemmung führt zu einer Stimulation der Ketogenese. Der kausale Zusammenhang ist wahrscheinlich durch eine verminderte Oxalacetatbildung aus dem Glykolyseendprodukt Pyruvat gegeben; dadurch kommt es einerseits zu einem Abfall der Malonyl-CoA-Konzentration mit nachfolgender Entthemmung der CAT I und vermehrter Einschleusung von Fettsäuren in die β -Oxidation; andererseits kann das vermehrt anfallende Acetyl-CoA nicht im Citratzyklus oxidiert werden und fließt somit in den HMG-CoA-Zyklus ab. Die Möglichkeit der Ketogenese stimulation ist jedoch nur unter extremen experimentellen Bedingungen (hohe Glykolysegeschwindigkeit, kein Lactat und Pyruvat im Perfusat, geringes Fettsäureangebot) verwirklicht. Sie ist außerdem wesentlich geringer als die Substrat-bedingte Steigerung der Ketogenese nach Fettsäuregabe. Im Rahmen der Kurzzeitregulation des Leberstoffwechsels durch Glucagon scheint die Ketogenese stimulation physiologisch nicht relevant zu sein.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 001 Aes, M., and Bremer, J. (1968)
Short-chain fatty acid activation in rat liver. A new assay procedure for enzymes and studies on their intracellular localization.
Biochim. Biophys. Acta 164, 157-166.
- 002 Aes, M. and Daae, L.N.W. (1971)
Fatty acid activation and acyl transfer in different nutritional states.
Biochim. Biophys. Acta 239, 208-216.
- 003 Abel, J.J., Geiling, E.M.K., Rouillet, C.A., Bell, F.K., and Wintersteiner, O. (1927)
Crystalline Insulin.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 31, 65, zitiert nach [48].
- 004 Ballard, F.J., and Hanson, R.W. (1969)
Measurement of adipose tissue metabolites in vivo.
Biochem. J. 112, 195-202.
- 005 Benito, M., Whitelaw, E., and Williamson, D.H. (1979)
Regulation of ketogenesis during the suckling-weanling transition in the rat.
Biochem. J. 180, 137-144.
- 006 Bergmeyer, H.U. (ed.) (1970)
Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.
- 007 Bewsher, P.D., and Ashmore, J. (1966)
Ketogenic and lipolytic effects of glucagon on liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 431-436.
- 008 Bewsher, P.D., Tarrant, M.E. and Ashmore, J. (1966)
Effects of fat mobilization on liver acetate metabolism.
Diabetes 15, 346-350.
- 009 Blair, J.B., Cimbala, M.A., Foster, J.L., and Morgan, R.A. (1976)
Hepatic pyruvate kinase regulation by glucagon, cyclic adenosine 3':5'-monophosphate, and insulin in the perfused rat liver.
J. Biol. Chem. 251, 3756-3762.
- 010 Bloom, S.R. (1981)
Control of glucagon secretion: an overview; in: Glucagon: physiology, pathophysiology and morphology of the pancreatic A-cells. Unger, R.H., and Orci, L. (eds.), Elsevier North Holland; pgs. 99-113.
- 011 Böttger, I., Schlein, E.M., Faloona, G.R., Knochel, J.P., and Unger, R.H. (1972)
The effect of exercise on glucagon secretion.
J. Endocrinol. Metab. 35, 117-125.

- 012 Bracht, A. (1980)
Untersuchung von Transportvorgängen in der perfundierten Rattenleber mit der Pulsmarkierungsmethode.
Inaugural-Dissertation, Biologische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 013 Bracht, A., Schwab, A.J. und Scholz, R. (1980)
Untersuchungen von Flußgeschwindigkeiten in der isolierten Rattenleber durch Pulsmarkierung mit radioaktiven Substraten und mathematischer Analyse der Auswaschkinetiken.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 357-377.
- 014 Brand, I.A., and Söling, H.D. (1975)
Activation and inactivation of rat liver phosphofructokinase by phosphorylation-dephosphorylation.
FEBS Lett. 57, 163-168.
- 015 Brauer, R.W., Pesotti, R.L., and Pizzolato, P. (1951)
Isolated rat liver preparation. Bile production and other basic properties.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 78, 174, zitiert nach [139].
- 016 Braun, W. (1976)
Bestimmung der Geschwindigkeit der Pyruvatdehydrogenase-Reaktion in der perfundierten Rattenleber.
Inaugural-Dissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 017 Bromer, W.W., Sinn, L.G., Staub, A., and Behrens, O.K. (1957)
The aminoacid sequence of glucagon.
Diabetes 6, 234, zitiert nach [48].
- 018 Buchanan, K.D., Vance, J.E., Dinstl, K., and Williams, R.H. (1969)
Effect of blood glucose on glucagon secretion in anaesthetized dogs.
Diabetes 18, 11-18.
- 019 Bürger, M. und Brandt, W. (1935)
Über das Glukagon (die hyperglykämisierende Substanz des Pankreas).
Zeit. ges. exp. Med. 96, 375, zitiert nach [48].
- 020 Bürger, M. und Kramer, H. (1928)
Über den hepatischen Angriffspunkt des Insulins. Die primäre paradoxe Insulinhyperglykämie.
Zeit. ges. exp. Med. 65, 487, zitiert nach [48].
- 021 Buschiazio, H., Exton, J.H., and Park, C.R. (1970)
Effects of glucose on glycogen synthase, phosphorylase, and glycogen deposition in the perfused rat liver.
Proc. Natl. Acad. Sci. 65, 383-387.
- 022 Busch, H., Hurlbert, B.R., and van Potter, R. (1951)
Separation of lactic, succinic, and malonic acids by ion-exchange chromatography.
Fed. proc. 10, 169, zitiert nach [16].

- 023 Butcher, R.W., Ho, R.J., Meng, H.C. and Sutherland, E.W. (1965)
Adenosine 3',5'-monophosphate in biological materials. II. The measurement of adenosine 3',5'-monophosphate in tissues and the role of the cyclic nucleotide in the lipolytic response of fat to epinephrine.
J. Biol. Chem. 240, 4515-4523.
- 024 Castano, J.G., Nieto, A., and Feliu, J.E. (1979)
Inactivation of phosphofructokinase by glucagon.
J. Biol. Chem. 254, 5576-5579.
- 025 Charles, M.A., Imagawa, W., Forsham, P.H., and Grodsky, G.M. (1976)
Islet transplantation into rat liver: in vitro secretion of insulin from the isolated perfused liver and in vivo glucagon suppression.
Endocrinology 98, 738, zitiert nach [147].
- 026 Cherrington, A.D., Chiasson, J.L., Liljenquist, J.E., Jennings, A.S., Keller, U., and Lacy, W.W. (1976)
The role of insulin and glucagon in the regulation of basal glucose production in the postabsorptive dog.
J. Clin. Invest. 58, 1407-1418.
- 027 Clark, L.C. (1956)
Monitoring and control of blood O_2 tension.
Am. Soc. Art. Int. Organe 2, 41, zitiert nach [139].
- 028 Clark, M. G., Kneer, N.M., Bosch, A.L., and Lardy, H.A. (1974)
The fructose 1,6-diphosphate-phosphofructokinase substrate cycle; a site of regulation of hepatic gluconeogenesis by glucagon.
J. Biol. Chem. 249, 5695-5703.
- 029 Claus, T.H., El-Maghrabi, M.R., Regen, D.M., Stewart, H.B., McGrane, M., Kountz, P.D., Nyfeler, F., Pilkis, J., and Pilkis, S.J. (1984)
The role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism.
Curr. Top. Cell. Regul. 23, 57-86.
- 030 Claus, T.H., Schlumpf, J.R., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J., and Pilkis, S.J. (1980)
Mechanism of action of glucagon on hepatocyte phosphofructokinase activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6501-6505.
- 031 Claycomb, W.C., and Kilsheimer, G.S. (1969)
Effect of glucagon, adenosine-3,5-monophosphate and theophylline on free fatty acid release by rat liver slices and on tissue levels of coenzyme-A esters.
Endocrinology 84, 1179-1183.
- 032 Collens, W.S., and Murlin, J.R. (1929)
Hyperglycemia following portal injection of insulin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 26, 485, zitiert nach [48].

- 033 Cook, G.A., King, M.T., and Veech, R.L. (1978)
Ketogenesis and malonyl coenzyme A content of isolated rat hepatocytes.
J. Biol. Chem. 253, 2529-2531.
- 034 Cook, G.A., Nielsen, R.C., Hawkins, R.A., Mehlman, M.A., Lakshmanan, M.R., and Veech, R.L. (1977)
Effect of glucagon on hepatic malonyl coenzyme A concentration and on lipid synthesis.
J. Biol. Chem. 252, 4421-4424.
- 035 Corbin, J.D., Reimann, E.M., Walsh, D.A., and Krebs, E.G. (1970)
Activation of adipose tissue lipase by skeletal muscle cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-stimulated protein kinase.
J. Biol. Chem. 245, 4849-4851.
- 036 Corey, E.L., and Britton, S.W. (1941)
Glycogen levels in the isolated liver perfused with cortico-adrenal extract, insulin and other properties.
Am J. Physiol. 131, 783-789.
- 037 Crespin, S.R., Greenough, W.B.III, and Steinberg, D. (1969)
Stimulation of insulin secretion by infusion of free fatty acids.
J. Clin. Invest. 48, 1934-1943.
- 038 Debeer, L.J., Thomas, J., de Schepper, P.J. and Mannaerts, G.P. (1979)
Lysosomal triacylglycerol lipase and lipolysis in isolated hepatocytes.
J. Biol. Chem. 254, 8841-8846.
- 039 Duckworth, W.C., Heinemann, C.M. (1975)
Insulin and glucagon degradation by kidney.
Clin. Res. 23:318A.
- 040 El-Maghrabi, M.R., Claus, T.H., Pilkis, J., and Pilkis, S.J. (1981)
Partial purification of a rat liver enzyme that catalyzes the formation of fructose 2,6-bisphosphate.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 1071-1077.
- 041 El-Maghrabi, M.R., Claus, T.H., Pilkis, J., and Pilkis, S.J. (1982)
Regulation of 6-phosphofructo-2-kinase activity by cyclic AMP-dependent phosphorylation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 315-319.
- 042 Emden, G. (1904)
Über die Zuckerbildung bei künstlicher Durchblutung in der glykogenfreien Leber.
Beitr. z. Chem. Physiol. u. Pathol. 6, 44, zitiert nach [139].
- 043 Emden, G. und Glaessner, K. (1902)
Beitr. z. Chem. Physiol. u. Pathol. 1, 213, zitiert nach [139].

- 044 Engström, L. (1978)
The regulation of liver pyruvate kinase by phosphorylation-dephosphorylation.
Curr. Top. Cell. Regul. 13, 29-51.
- 045 Exton, J.H. (1981)
The effects of glucagon on hepatic glycogen metabolism and gluconeogenesis; in: Glucagon: physiology, pathophysiology and morphology of the pancreatic A-cells.
Unger, R.H., and Orci, L. (eds.), Elsevier North Holland; pgs. 195-220.
- 046 Fehlig, P., Gusberg, R., Hendler, R., Gump, F.E., and Kinney, J.M. (1974)
Concentration of glucagon and the glucagon:insulin ratio in the portal and peripheral circulation.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147, 88-90.
- 047 Fischer, A., Molnar, G. und Takacs, L. (1961)
O2-Verbrauch der Leber bei experimenteller Zirrhose.
Acta Med. Acad. Sci. Hung. 17, 33, zitiert nach [139].
- 048 Foa, P.P. and Galansino, M.D. (1962)
Glucagon: chemistry and function in health and disease.
Charles C. Thomas, Publ., Springfield, Illinois (USA) 1962
- 049 Forrest, J.N., Fisher, M., Hendler, R., Sherwin, R., and Fehlig, P. (1976)
Contrasting roles of the kidney in the disposal and hormonal action of physiologic concentrations of glucagon.
Clin. Res. 24, 400A.
- 050 Foster, D.W. (1984)
Banting Lecture 1984. From glycogen to ketones - and back.
Diabetes 33, 1188-1199.
- 051 Fritz, I.B. (1961)
Factors influencing the rates of long-chain fatty acid oxidation and synthesis in mammalian systems.
Physiol. Rev. 41, 52-129.
- 052 Furuya, E., and Uyeda, K. (1980)
An activation factor of liver phosphofructokinase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5861-5864.
- 053 Furuya, E., Yokoyama, M., and Uyeda, K. (1982)
Regulation of fructose-6-phosphate 2-kinase by phosphorylation and dephosphorylation: possible mechanism for coordinated control of glycolysis and glycogenolysis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 325-329.

- 054 Geiling, E.M.K., and de Lawder, A.M. (1930)
Studies on crystalline insulin. XI. Does insulin cause an initial hyperglycemia?
J. Pharmacol. Exp. Ther. 39, 369, zitiert nach [48].
- 055 Gibbs, C.B.F., Root, E.W., Jr., and Murlin, J.R. (1923)
The gluconeogenic substance in extracts of pancreas and other tissues.
Quart. J. Exp. Physiol., 13 (Suppl.), 128, zitiert nach [48].
- 056 Glinzmann, W., Hern, E.P., and Lynch, A. (1969)
Intrinsic regulation of glucose output by rat liver.
Am. J. Physiol. 216, 698-703.
- 057 Glinzmann, W., Pauk, G., and Hern, E. (1970)
Control of rat liver glycogen synthase and phosphorylase activities by glucose.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 774-782.
- 058 Guder, W.G., Schmidt, U., Funk, B., Weis, J., and Pürschel, S. (1976)
Liver cell heterogeneity. The distribution of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the liver lobule of fed and starved rats.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1793-1800.
- 059 Halestrap, A.P. (1978)
Stimulation of the respiratory chain of rat liver mitochondria between cytochrome c1 and cytochrome c by glucagon treatment of rats.
Biochem. J. 172, 399-405.
- 060 Halestrap, A.P. (1982)
The nature of the stimulation of the respiratory chain of rat liver mitochondria by glucagon pretreatment of animals.
Biochem. J. 204, 37-47.
- 061 Hanson, P.G., Johnson, R.E., and Zaharko, D.S. (1965)
Correlation between ketone body and free fatty acid concentrations in the plasma during early starvation in man.
Metabolism 14, 1037-1040.
- 062 Harano, Y., Kowal, J., Yamazaki, R., Lavine, L., and Miller, M. (1972)
Carnitine palmitoyltransferase activities (1 and 2) and the rate of palmitate oxidation in liver mitochondria from diabetic rats.
Arch. Biochem. Biophys. 153, 426-437.
- 063 Heimberg, M., Weinstein, I., and Kohout, M. (1969)
The effects of glucagon, dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and concentration of free fatty acid on hepatic lipid metabolism.
J. Biol. Chem. 244, 5131-5139.

- 064 Hems, D.A., and Whitton, P.D. (1980)
Control of hepatic glycogenolysis.
Phys. Rev. 60, 1-50.
- 065 Hers, H.-G., and van Schaftingen, E. (1982)
Review article; fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its
discovery.
Biochem. J. 206, 1-12.
- 066 Hohorst, H.J., Kreutz, F.H. und Bücher, Th. (1959)
Über Metabolitgehalte und Metabolit-Konzentrationen in der Leber
der Ratte.
Biochem. Z. 332, 18-46.
- 067 Hohorst, H.J., Kreutz, F.H., and Reim, M. (1961)
The oxidation/reduction state of the extramitochondrial DNP/DNPH
system in rat liver and the hormonal control of substrate levels
in vivo.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 163-168.
- 068 Horrocks, D.L. (1977)
The H-number concept.
Beckmann Publication 1095, NUC-77-1T.
- 069 Hue, L., Blackmore, P.F., and Exton, J.H. (1981)
Fructose 2,6-bisphosphate; hormonal regulation mechanism of its
formation in liver.
J. Biol. Chem. 256, 8900-8903.
- 070 Hue, L., Bontemps, F., and Hers, H.-G. (1975)
The effect of glucose and potassium ions on the interconversion of
the two forms of glycogen phosphorylase and of glycogen synthetase
in isolated rat liver preparations.
Biochem. J. 152, 105-114.
- 071 Hue, L., Feliu, J.E., and Hers, H.-G. (1978)
Control of gluconeogenesis and of enzymes of glycogen metabolism in
isolated rat hepatocytes; a parallel study of the effect of phenyl-
ephrine and of glucagon.
Biochem. J. 176, 791-797.
- 072 Huth, W., Jonas, R., Wunderlich, I., and Seubert, W. (1975)
On the mechanism of ketogenesis and its control.
Eur. J. Biochem. 59, 475-489.
- 073 Huth, W., and Menke, R. (1982)
Regulation of ketogenesis. Mitochondrial acetyl-CoA acetyltrans-
ferase from rat liver: initial-rate kinetics in the presence of
the product CoASH reveal intermediary plateau regions.
Eur. J. Biochem. 128, 413-419.

- 074 Huth, W., Stermann, R., Holze, G., and Seubert, W. (1981)
Regulation of ketogenesis at the site of acetyl-CoA acetyltransferase; in: Biochemical and clinical aspects of ketone body metabolism; Söling, H.-D. and Seufert, C.-D. (eds.).
G. Thieme Publ. Stuttgart, pgs. 11-23.
- 075 Jensen, C.B., Sistare, F.D., Hamman, H.C., and Haynes, C., Jr. (1983)
Stimulation of mitochondrial functions by glucagon treatment. Evidence that effects are no artifacts of mitochondrial isolation. Biochem. J. 210, 819-827.
- 076 Kagimoto, T., and Uyeda, K. (1980)
Regulation of rat liver phosphofructokinase by glucagon-induced phosphorylation. Arch. Biochem. Biophys. 203, 792-799.
- 077 Katz, J., and Rognstad, R. (1976)
Futile cycles in the metabolism of glucose. Curr. Top. Cell. Regul. 10, 237-289.
- 078 Keller, U., and Shulman, G. (1979)
Effect of glucagon on hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis in conscious dog. Am. J. Physiol. 237, E121-129.
- 079 Kerzel, W. (1982)
Die Wirkungen von Glucose, Insulin und Glucagon auf die Geschwindigkeit des Substratflusses durch die Glykolyse in isolierten, perfundierten Rattenlebern. Inauguraldissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 080 Kim, K.-H. (1983)
Regulation of acetyl-CoA carboxylase. Curr. Top. Cell. Regul. 22, 143-176.
- 081 Kimball, C.P., Murlin, J.R. (1923)
Aqueous extracts of pancreas. III. Some precipitation reactions of insulin. J. Biol. Chem. 58, 337, zitiert nach [48].
- 082 Kimmig, R., Mauch, T.J., Kerzl, W., Schwabe, U., and Scholz, R. (1983)
Actions of glucagon on flux rates in perfused rat liver. 1. Kinetics of the inhibitory effect on glycolysis and the stimulatory effect on glycogenolysis. Eur. J. Biochem. 136, 609-616.
- 083 Kimmig, R., Mauch, T.J., and Scholz, R. (1983)
Actions of glucagon on flux rates in perfused rat liver. 2. Relationship between inhibition of glycolysis and stimulation of respiration by glucagon. Eur. J. Biochem. 136, 617-620.

- 084 Klausner, H.J., Soler-Agrilaga, C., and Heimberg, M. (1978)
Effects of dibutyl adenosine 3'5'-monophosphate on hepatic metabolism of free fatty acids.
Metabolism 27, 13-25.
- 085 Kopec, B., and Fritz, I.B. (1971)
Properties of a purified carnitine palmitoyltransferase, and evidence for the existence of other carnitine acyltransferases.
Can. J. Biochem. 49, 941-948.
- 086 Kopec, B., and Fritz, I.B. (1973)
Comparison of properties of carnitine palmitoyltransferase I with those of carnitine palmitoyltransferase II, and preparations of antibodies to carnitine palmitoyltransferase.
J. Biol. Chem. 248, 4069-4074.
- 087 Krebs, H.A. (1966)
The regulation of the release of ketone bodies by the liver.
Adv. Enzyme Regul. 4, 339-353.
- 088 Krebs, H.A., and Hems, R. (1970)
Fatty acid metabolism in the perfused rat liver.
Biochem. J. 119, 525-533.
- 089 Krebs, H.A. und Henseleit, H. (1932)
Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33-66.
- 090 Kühn, A., and Scholz, R. (1982)
Rates of flux through the pentose cycle in perfused rat liver. A procedure for the calculation of rates of substrate flux from $^{14}\text{CO}_2$ production from [1- ^{14}C]glucose.
Eur. J. Biochem. 124, 611-617.
- 091 Lane, D.M., and Mooney, R.A. (1981)
Tricarboxylic acid cycle intermediates and the control of fatty acid synthesis and ketogenesis.
Curr. Top. Cell. Regul. 18, 221-242.
- 092 Lee, L.P.K., and Fritz, I.B. (1972)
Factors controlling ketogenesis by rat liver mitochondria.
Canad. J. Biochem. 50, 119-127.
- 093 Lefebvre, P.J., and Luycks, A.S. (1981)
The physiology of extrapancreatic glucagon; in: *Glucagon: physiology, pathophysiology and morphology of the pancreatic A-cells.* Unger, R.H., and Orci, L. (eds.), Elsevier North Holland; pgs. 335-348.
- 094 Liljenquist, J.E., Bamboy, J.D., Lewis, S.B., Sinclair-Smith, B.C., Felts, P.W., Lacy, W.W., Crofford, O.B., and Liddle, G.W. (1974)
Effects of glucagon on lipolysis and ketogenesis in normal and diabetic men.
J. Clin. Invest. 53, 190-197.

- 095 Lindsey, C.A., Faloona, G.R., and Unger, R.H. (1973)
Glucagon and the insulin:glucagon ratio in severe trauma.
Trans. Assoc. Am. Physiol. 86, 264-271.
- 096 Lund, H., Borrebaek, B., and Bremer, J. (1980)
Regulation of palmitate esterification/oxidation by glucagon in iso-
lated hepatocytes. The role of α -glycerophosphate concentration.
Biochim. Biophys. Acta 620, 364-371.
- 097 Mayes, P.A., and Felts., J.M. (1967)
Regulation of fat metabolism in the liver.
Nature 215, 716-718.
- 098 McGarry, J.D., and Foster, D.W. (1971)
The regulation of ketogenesis from octanoic acid.
J. Biol. Chem. 246, 1149-1159.
- 099 McGarry, J.D., and Foster, D.W. (1971)
The regulation of ketogenesis from oleic acid and the influence of
antiketogenic agents.
J. Biol. Chem. 246, 6247-6253.
- 100 McGarry, J.D., and Foster, D.W. (1973)
The metabolism of (-)octanoylcarnitine in perfused livers from fed
and fasted rats. Evidence for a possible regulatory role of carni-
tine acyltransferase in the control of ketogenesis.
J. Biol. Chem. 249, 7984-7990.
- 101 McGarry, J.D., and Foster, D.W. (1979)
In support of the roles of malonyl-CoA and carnitine acyltransfe-
rase I in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and keto-
genesis.
J. Biol. Chem. 254, 8163-8168.
- 102 McGarry, J.D., and Foster, D.W. (1980)
Effects of exogenous fatty acid concentration on glucagon-induced
changes in hepatic fatty acid metabolism.
Diabetes 29, 236-240.
- 103 McGarry, J.D., and Foster, D.W. (1980)
Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body
production.
Ann. Rev. Biochem. 49, 395-420.
- 104 McGarry, J.D., Leatherman, G.F., and Foster, D.W. (1978)
Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic
fatty acid oxidation by malonyl-CoA.
J. Biol. Chem. 253, 4128-4136.
- 105 McGarry, J.D., Mannaerts, G.P., and Foster, D.W. (1977)
A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty
acid oxidation and ketogenesis.
J. Clin. Invest. 60, 265-270.

- 106 McGarry, J.D., Mannaerts, G.P., and Foster, D.W. (1978)
Characteristics of fatty acid oxidation in rat liver homogenates
and the inhibitory effect of malonyl-CoA.
Biochim. Biophys. Acta 530, 305-313.
- 107 McGarry, J.D., Meyer, J.M., and Foster, D.W. (1973)
The effects of starvation and refeeding on carbohydrate and lipid
metabolism in vivo and in the perfused rat liver.
J. Biol. Chem. 248, 270-278.
- 108 McGarry, J.D., Stark, M.J., and Foster, D.W. (1978)
Hepatic malonyl-CoA levels of fed, fasted and diabetic rats as
measured using a simple radioisotopic assay.
J. Biol. Chem. 253, 8291-8293.
- 109 McGarry, J.D., Takabayashi, Y., and Foster, D.W. (1978)
The role of malonyl-CoA in the coordination of fatty acid synthesis
an oxidation in isolated rat hepatocytes.
J. Biol. Chem. 253, 8294-8300.
- 110 McGarry, J.D., Wright, P.H., and Foster, D.W. (1975)
Hormonal control of ketogenesis. Rapid activation of hepatic keto-
genic capacity in fed rats by anti-insulin serum and glucagon.
J. Clin. Invest. 55, 1202-1209.
- 111 Menahan, L.A., Hron, W.T., Hinkelman, D.G., and Mizioroko, H.M.
(1981)
Interrelationships between 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase,
acetoacetyl-CoA and ketogenesis.
Eur. J. Biochem. 119, 287-294.
- 112 Menahan, L.A., and Wieland, O. (1969)
The role of endogenous lipid in gluconeogenesis and ketogenesis of
perfused rat liver.
Eur. J. Biochem. 9, 182-188.
- 113 Miller, L.L., Bly, C.G., Watson, M.L., and Bale, W.F. (1951)
The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. A
direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of
lysine-e-C14.
J. Expt. Med. 94, 431-453.
- 114 Moriyama, T., and Srere, P.A. (1971)
Purification of rat heart and rat liver citrate synthetases.
J. Biol. Chem. 246, 3217-3223.
- 115 Nimmo, H.G. (1981)
Regulation of lipolysis; in: *Glucagon: physiology, pathophysiology,
and morphology of the pancreatic A-cells.*
Unger, R.H., and Orci, L. (eds.), Elsevier North Holland;
pgs. 263-272.

- 116 Norum, K.R. (1965)
Activation of palmityl-CoA:carnitine palmityltransferase in livers from fasted, fat-fed, or diabetic rats.
Biochim. Biophys. Acta 98, 652-654.
- 117 Nosadini, R., Datta, H., Hadson, A., and Alberti, K.G.M.M. (1980)
A possible mechanism for the antiketogenic action of alanine in the rat.
Biochem. J. 190, 323-332.
- 118 Ohneda, A., Aguilar-Parada, E., Eisentraut, A.M., and Unger, R.H. (1969)
Control of pancreatic glucagon secretion by glucose.
Diabetes 18, 1-10.
- 119 Ontko, J.A. (1972)
Metabolism of free fatty acids in isolated liver cells.
J. Biol. Chem. 247, 1788-1800.
- 120 Ontko, J.A., and Zilversmit, D.B. (1966)
Proc. Soc. Exp. Med. 121, 319-321, zitiert nach [103].
- 121 Orci, L., and Perrelet, A. (1981)
The morphology of the A-cell; in: Glucagon: physiology, pathophysiology and morphology of the pancreatic A-cells.
Unger, R.H., and Orci, L. (eds.), Elsevier North Holland; pgs. 3-36.
- 122 Parilla, R., Jimenez, I., and Ayouso-Parilla, M.S. (1975)
Glucagon and insulin control of gluconeogenesis in the perfused isolated rat liver. Effects on cellular metabolite distribution.
Eur. J. Biochem. 56, 375-383.
- 123 Pilkis, S.J., Chrisman, T., Burgess, B., McGrane, M., Colosia, A., Pilkis, J., Claus, T.H., and El-Maghrabi, M.R. (1983)
Rat hepatic 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase - a unique bifunctional enzyme regulated by cyclic AMP-dependent phosphorylation.
Adv. Enzyme Regul. 21, 147-173.
- 124 Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., McGrane, M., Pilkis, J., and Claus, T.H. (1982)
Regulation by glucagon of hepatic pyruvate kinase, 6-phosphofructo 1-kinase, and fructose-1,6-bisphosphatase.
Fed. Proc. 41, 2623-2628.
- 125 Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., Pilkis J., Claus, T.H., and Cumming, D.D. (1981)
Fructose 2,6-bisphosphate; a new activator of phosphofructokinase.
J. Biol. Chem. 256, 3171-3174.

- 126 Pilkis, S., Schlumpf, J., Pilkis, J., and Claus, T.H. (1979)
Regulation of phosphofructokinase activity by glucagon in isolated rat hepatocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 960-967.
- 127 Rappaport, A.M. (1960)
Betrachtungen zur Pathophysiologie der Leberstruktur.
Klin. Wschr. 38, 561-577.
- 128 Raskin, P., McGarry, J.D., and Foster, D.W. (1974)
Independence of cholesterol and fatty acid biosynthesis from cyclic adenosine monophosphate concentration in the perfused rat liver.
J. Biol. Chem. 249, 6029-6032.
- 129 Reed, W.D., Clinkenbeard, K.D., and Lane, M.D. (1975)
Molecular and catalytic properties of mitochondrial (ketogenic) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase of liver.
J. Biol. Chem. 250, 3117-3123.
- 130 Richards, C.S., and Uyeda, K. (1982)
Hormonal regulation of fructose-6-P₂-kinase and fructose-2,6-P₂ by two mechanisms.
J. Biol. Chem. 257, 8854-8861.
- 131 Richards, C.S., Yokoyama, M., Furuya, E., and Uyeda, K. (1982)
Reciprocal changes in fructose-2,6-bisphosphate activity in response to glucagon and epinephrine.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 104, 1073-1079.
- 132 Riou, J.P., Claus, T.H., and Pilkis, S.J. (1976)
Control of pyruvate kinase activity by glucagon in isolated hepatocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 591-599.
- 133 Robinson, A.M., and Williamson, D.H. (1980)
Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues.
Phys. Rev. 60, 143-187.
- 134 Robinson, G.A., Butcher, R.W., and Sutherland, E.W. (1971)
Cyclic AMP.
Academic Press, Inc. (London) Ltd., 1971.
- 135 Rodbell, M. (1981)
The action of glucagon on the adenylate cyclase system; in: Glucagon: physiology, pathophysiology and morphology of the pancreatic A-cells.
Unger, R.H., and Orci, L. (eds.), Elsevier North Holland; pgs. 177-194.
- 136 Rognstad, R. (1982)
14CO₂ fixation by phosphoenolpyruvate carboxykinase during gluconeogenesis in the intact rat liver cell.
J. Biol. Chem. 257, 11486-11488.

- 137 Sasse, D., Katz, and Jungermann, K. (1975)
Functional heterogeneity of rat liver parenchyma and of isolated hepatocytes.
FEBS Lett. 57, 83-88.
- 138 Schimassek, H. (1962)
Perfusion of isolated rat liver with a semisynthetic medium and control of liver function.
Life Sciences 11, 629-634.
- 139 Scholz, R. (1967)
Hämoglobinfreie Durchströmung der isolierten Rattenleber und Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung.
Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 140 Scholz, R., and Bücher, Th. (1965)
Hemoglobin-free perfusion of rat liver; in: Control of energy metabolism; Chance, B. (ed.).
Acad. Pr., pgs. 393-414.
- 141 Scholz, R., Hansen, W., and Thurman, R.G. (1973)
Interaction of mixed function oxidation with biosynthetic processes. 1. Inhibition of gluconeogenesis by aminopyrine in perfused rat liver.
Eur. J. Biochem. 38, 64-72.
- 142 Scholz, R., Schwabe, U., and Soboll, S. (1984)
Influence of fatty acids on energy metabolism. 1. Stimulation of oxygen consumption, ketogenesis and CO₂ production following addition of octanoate and oleate in perfused rat liver.
Eur. J. Biochem. 141, 223-230.
- 143 Scholz, R., Schwarz, F. und Bücher, Th. (1966)
Barbiturate und energieliefernder Stoffwechsel in der hämoglobin-frei durchströmten Leber der Ratte.
Z. Klin. Chem. 4, 179-189.
- 144 Schwab, A.J., Bracht, A., and Scholz, R. (1979)
Transport of D-lactate in perfused rat liver.
Eur. J. Biochem. 102, 537-547.
- 145 Seyffert, W.A.Jr., and Madison, L.L. (1967)
Physiologic effects of metabolic fuels on carbohydrate metabolism. I. Acute effect of plasma free fatty acids on hepatic glucose output, peripheral glucose utilization, serum insulin, and plasma glucagon levels.
Diabetes 16, 765-776.
- 146 Shepherd, D., and Garland, P.B. (1969)
The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria.
Biochem. J. 114, 597-610.

- 147 Sherwin, R., and Felig, P. (1977)
Glucagon physiology in health and disease.
Int. Rev. Physiol., Endocr. Physiol. II, 16, 151-171.
- 148 Shoemaker, W.C., van Itallie, T.B. (1960)
The hepatic response to glucagon in the unaesthetized dog.
Endocrinology 66, 260-269.
- 149 Siess, E.A., Brocks, D.G., Lattke, H.K., and Wieland, O.H. (1977)
Effect of glucagon on metabolite compartmentation in isolated rat liver cells during gluconeogenesis from lactate.
Biochem. J. 166, 225-235.
- 150 Siess, E.A., Brocks, D.G., and Wieland, O.H. (1978)
Distribution of metabolites between the cytosolic and mitochondrial compartments of hepatocytes isolated from fed rats.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 785-798.
- 151 Siess, E.A., Fahimi, F.M., and Wieland, O.H. (1981)
Evidence that glucagon stabilizes rather than activates mitochondrial functions in rat liver.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1643-1651.
- 152 Siess, E.A., Kientsch-Engel, R.I., and Wieland, O.H. (1982)
Role of free oxaloacetate in ketogenesis.
Eur. J. Biochem. 121, 493-499.
- 153 Siess, E.A., Kientsch-Engel, R.I., and Wieland, O.H. (1984)
Concentration of free oxaloacetate in the mitochondrial compartment of isolated liver cells.
Biochem. J. 218, 171-176.
- 154 Siess, E.A., and Wieland, O.H. (1979)
Isolated hepatocytes as a model for the study of stable glucagon effects on mitochondrial respiratory functions.
FEBS Lett. 101, 277-281.
- 155 Siess, E.A., and Wieland, O.H. (1980)
Early kinetics of glucagon action in isolated hepatocytes at the mitochondrial level.
Eur. J. Biochem. 110, 203-210.
- 156 Singh, B., Osmundsen, H., and Borrebaek, B. (1982)
The time course of glucagon action on the utilization of [U-¹⁴C]palmitate by isolated hepatocytes.
Arch. Biochem. Biophys. 217, 244-250.
- 157 Söling, H.-D., and Brand, I. A. (1981)
Covalent modification of phosphofructokinase by phosphorylation-dephosphorylation.
Curr. Top. Cell. Regul. 20, 107-138.

- 158 Söling, H.-D., and Seufert, C.D. (eds.) (1978)
Biochemical and clinical aspects of ketone body metabolism.
Thieme Publ. Stuttgart 1978.
- 159 Stalmans, W., de Wulf, H., and Hers, H.-G. (1971)
The control of liver glycogen synthetase phosphatase by phosphorylase.
Eur. J. Biochem. 18, 582-587.
- 160 Stalmans, W., de Wulf, H., Lederer, B., and Hers, H.-G. (1970)
The effect of glucose and of treatment by glucocorticoids on the inactivation in vitro of liver glycogen phosphorylase.
Eur. J. Biochem. 15, 9-12.
- 161 Stalmans, W., Laloux, M., and Hers, H.-G. (1974)
The interaction of liver phosphorylase a with glucose and AMP.
Eur. J. Biochem. 49, 415-427.
- 162 Staub, A. und Behrens, O.K. (1953)
Purification and crystallisation of hyperglycemic-glycogenolytic factor (HGF).
Science 117, 628, zitiert nach [48].
- 163 Sugden, M.C., and Williamson, D.H. (1981)
Short-term hormonal control of ketogenesis; in: Short-term regulation of liver metabolism.
Hue, L., and van de Werve, G. (eds.); Elsevier North Holland, pgs. 291-309.
- 164 Suzuki, Y. (1964)
Chem. Abstr. 61, 12280h, zitiert nach [154].
- 165 Taunton, O.D., Stifel, F.B., Greene, H.L., and Herman, R.H. (1972)
Rapid reciprocal changes of rat hepatic glycolytic enzymes and fructose-1,6-diphosphatase following glucagon and insulin injection in vivo.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1663-1670.
- 166 Taunton, O.D., Stifel, F.B., Greene, H.L., and Herman, R.H. (1974)
Rapid reciprocal changes in rat hepatic glycolytic enzymes and fructose diphosphatase activities following insulin and glucagon injection.
J. Biol. Chem. 249, 7228-7239.
- 167 Thurman, R.G., and Scholz, R. (1969)
Mixed function oxidation in perfused rat liver. The effect of aminopyrine on oxygen uptake.
Eur. J. Biochem. 10, 459-467.
- 168 Thurman, R.G., and Scholz, R. (1977)
Interaction of glycolysis and respiration in perfused rat liver. Changes in oxygen uptake following the addition of ethanol.
Eur. J. Biochem. 75, 13-21.

- 169 Trowell, O.A. (1942)
Urea formation in the isolated perfused liver of the rat.
J. Physiol. 100, 432-458.
- 170 Tzur, R., Tal, E., and Shapiro, B. (1964)
Alpha-glycerophosphate as regulatory factor in fatty acid esterification.
Biochim. Biophys. Acta 84, 18-23.
- 171 Uyeda, K., Furuya, E., and Luby, L.J. (1981)
The effect of natural and synthetic D-fructose 2,6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinases.
J. Biol. Chem. 256, 8394-8399.
- 172 Van Harken, D.R., Dixon, C.W., and Heimberg, M. (1969)
Hepatic lipid metabolism in experimental diabetes.
J. Biol. Chem. 244, 2278-2285.
- 173 Van Schaftingen, E., Davies, D.R., and Hers, H.-G. (1982)
Fructose-2,6-bisphosphatase from rat liver.
Eur. J. Biochem. 124, 143-149.
- 174 Van Schaftingen, E., and Hers, H.-G. (1981)
Phosphofructokinase 2, the enzyme that forms fructose 2,6-bisphosphate from fructose 6-phosphate and ATP.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 1078-1084.
- 175 Van Schaftingen, E., Hue, L., and Hers, H.-G. (1980)
Fructose 2,6-bisphosphate, the probable structure of the glucose- and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase.
Biochem. J. 192, 897-901.
- 176 Van Schaftingen, E., Jett, M.-F., Hue, L., and Hers, H.-G. (1981)
Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3483-3486.
- 177 Veech, R.L., Rajman, L., and Krebs, H.A. (1970)
Equilibrium relations between the cytoplasmic adenine nucleotide system and nicotinamide-adenine nucleotide system in rat liver.
Biochem. J. 117, 499-503.
- 178 Vranic, M., Kawamori, R., Pek, S., Kowacevic, N., and Wrenshall, G.A. (1976)
The essentiality of insulin and the role of glucagon in regulating glucose utilization and production during strenuous exercise in dogs.
J. Clin. Invest. 57, 245-255.
- 179 Warburg, O. (1938)
Chemische Konstitution von Fermenten.
Erg. Enzymforschung 7, 210, zitiert nach [16].

- 180 Wieland, O. (1968)
Ketogenesis and its regulation.
Adv. Metab. Disord. 3, 1-47.
- 181 Wieland, O., and Matschinsky, F. (1962)
Life Sciences 2, 49-54, zitiert nach [103].
- 182 Wieland, O., Matschinsky, F., Löffler, G., and Müller, U. (1961)
Die Abhängigkeit der Ketonkörperbildung der Leber vom DPNH-Spiegel.
Biochim. Biophys. Acta 53, 412-414.
- 183 Wieland, O., Weiss, L., and Eger-Neufeldt, I. (1964)
Enzymatic regulation of liver acetyl-CoA metabolism in relation to ketogenesis.
Adv. Enzyme Regul. 2, 85-99.
- 184 Williamson, D.H. (1979)
Recent developments in ketone-body metabolism.
Bioch. Soc. Trans. 7, 1313-1321.
- 185 Williamson, D.H., Veloso, D., Ellington, E.V., and Krebs, H.A. (1969)
Changes in the concentrations of hepatic metabolites on administration of dihydroxyacetone or glycerol to starved rats and their relationship to the control of ketogenesis.
Biochem. J. 114, 575-584.
- 186 Williamson, D.H., and Whitelaw, E. (1978)
Abstr. FEBS Symp. 11th 42, 151-160, zitiert nach [184].
- 187 Williamson, J.R. (1966)
Control of gluconeogenesis by acetyl-coA in rats treated with glucagon and anti-insulin serum.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 765-770.
- 188 Williamson, J.R., Browning, E.T., Thurman, R.G., and Scholz, R. (1969)
Inhibition of glucagon effects in perfused rat liver by (+)decanoyl-carnitine.
J. Biol. Chem. 244, 5055-5064.
- 189 Willms, B., Böttcher, M., Wolters, V., Sakamoto, N., and Söling, H.D. (1969)
Relationship between fat and ketone body metabolism in obese and nonobese diabetics and nondiabetics during norepinephrine infusion.
Diabetologia 5, 88-96.
- 190 Witters, L.A., Moriarity, D., and Martin, D.B. (1979)
Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by insulin and glucagon.
J. Biol. Chem. 254, 6644-6649.

- 191 Witters, L.A., and Trasko, C.E. (1979)
Regulation of hepatic free fatty acid metabolism by glucagon and insulin.
Am. J. Physiol. 237, E23-29.
- 192 Yamazaki, R.K. (1975)
Glucagon stimulation of mitochondrial respiration.
J. Biol. Chem. 250, 7924-7930.
- 193 Yuki, T.B., Bradford, B.U., and Thurman, R.G. (1980)
Role of hormones in the mechanism of the swift increase in alcohol metabolism in the rat.
Pharmacol. Biochem. Behav. 13, 67-71.
- 194 Zammit, V.A. (1981)
Intrahepatic regulation of ketogenesis.
TIBS Feb. 81 (6), 46-49.
- 195 Zwiebel, F.M. (in Vorbereitung)
Inaugural-Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 196 Zwiebel, F.M., and Scholz, R. (1985)
Hormonal control of gluconeogenesis.
Kraus-Friedmann, N. (ed.); CRC press, Boca raton (in press).

Bei Herrn Prof. Dr. med. Roland Scholz bedanke ich mich für die großzügige Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Überlassung des Themas. Ganz besonders danke ich ihm für die Anleitung zu wissenschaftlichem Arbeiten, seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft, seine Anregungen und seine Unterstützung dieser Arbeit in jeder Beziehung.

Großen Dank schulde ich darüberhinaus Frau Teri Jo Mauch, Frau Bärbel Müller, Frau Ursula Schwabe und Herrn Ali Schallweg für die oft gewährte Unterstützung bei Vorbereitung und Durchführung der Experimente, Frau Silke Grotta für ihre Unterstützung und das Korrekturlesen des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Müllhofer, Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Andreas Schwab, Herrn Prof. Dr. med. Elmar Siess und ganz besonders Herrn Franz Maximilian Zwiebel danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Anregungen.

LEBENS LAUF

Am 30. Juni 1959 wurde ich, Klaus Rainer Kimmig, als erstes Kind des Ehepaares Dr. med. Klaus und Dr. med. Ursula Kimmig, geb. Faehndrich in Stuttgart geboren.

In Stuttgart-Degerloch besuchte ich von 1966 - 1969 die Volksschule (Altschule). Im Sommer 1969 trat ich in das Karlsgymnasium Stuttgart über, an dem ich im Mai 1978 die Reifeprüfung ablegte.

Das Studium der Medizin nahm ich im WS 1978/79 an der Ludwig-Maximilians-Universität München auf, wo ich im August 1980 das Physikum bestand. Im selben Jahr begann ich mit den Arbeiten zu der vorliegenden Dissertationsarbeit bei Herrn Prof. Dr. med. Roland Scholz im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Nach 12 Semestern bestand ich im Dezember 1984 die Ärztliche Prüfung.

Im Januar und Februar 1985 war ich im genannten Institut als wissenschaftliche Hilfskraft beschäftigt, bevor ich im März 1985 zur Ableistung meines Grundwehrdienstes einberufen wurde. Seit April 1985 bin ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Pathologie des Bundeswehrzentralkrankenhauses Koblenz unter der Leitung von Herrn Oberstarzt Dr. med. Reinhard Schäfer tätig.

